UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

ANNEE 1970 No 49

# CONTRIBUTION A L'ÉTUDE des LIPIDES du REIN NORMAL

THÈSE

POUR LE DOCTORAT EN PHARMACIE

(diplôme d'Etat)

Présentée et soutenue publiquement en JUILLET 1970

par

CÉCILIA SOUILLARD

*Pharmacien*

*Licenciée es-Sciences*

*Assistante de Biochimie*

Membres du Jury...

| | | |
|---|---|---|
| MM. | DOUSTE-BLAZY | *Président* |
| | J. BREUILLAUD | *Assesseurs* |
| | G. SOULA | |
| | P. BOURBON | |
| | J. CROS | *Suppléant* |

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546523_0028

# CONTRIBUTION

# A L'ETUDE DES LIPIDES

# DU REIN NORMAL

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

UNIVERSITE
DE
TOULOUSE

FACULTE MIXTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE

TABLEAU DU PERSONNEL

| | | |
|---|---|---|
| Doyen | : | Monsieur LAZORTHES |
| Assesseur (Médecine) | : | Monsieur MONNIER |
| Assesseur (Pharmacie) | : | Monsieur BREUILLAUD |
| Doyens honoraires | : | MM. GORSE, CALVET, BRUSTIER |
| Professeurs honoraires | : | MM. VALLOIS, TAPIE, DELAS, RISER, BUGNARD, VINCENT, MOREL, BOUISSET, CALMETTES, THOMAS, LAGROT, DULUCQ. |

SECTION MEDECINE

| | |
|---|---|
| - Clinique médicale et cardiologique | MM. MERIEL |
| - Clinique médicale sud | GADRAT |
| - Clinique chirurgicale | FICAT |
| - Clinique chirurgicale et gynécologie | FABRE P. |
| - Clinique chirurgicale et du cancer | GRIMOUD |
| - Clinique chirurgicale infantile et orthopédie | PASQUIE |
| - Clinique chirurgicale orthopédique et traumatologique | RIEUNAU |
| - Clinique de chirurgie cardio-vasculaire | ENJALBERT |
| - Clinique des maladies cutanées et syphilitiques | BAZEX |
| - Clinique des maladies des voies urinaires | LHEZ |
| - Clinique des maladies infectieuses | N |
| - Clinique médicale infantile et puériculture | SOREL |
| - Clinique médicale de la première enfance | BARDIER |
| - Clinique de neuro-chirurgie | LAZORTHES |
| - Clinique neurologique et psychiatrique | GERAUD |
| - Clinique obstétricale | PONTONNIER |
| - Clinique odonto-stomatologique | CADENAT |
| - Clinique ophtalmologique | N |
| - Clinique O. R. L. et chirurgie maxillo-faciale | CALVET |
| - Clinique de pneumo-phtisiologie | DELAUDE |
| - Clinique rhumatologique | RUFFIE R. |
| - Accouchement et obstétricie sociale | JAHIER |
| - Anatomie | BASTIDE |
| - Anatomie appliquée | POULHES |
| - Anatomie pathologique | FABRE J. |
| - Anesthésie et réanimation | LARENG |
| - Bactériologie et virologie | Mme ENJALBERT |

| | |
|---|---|
| - Biophysique médicale A | MM. AUVERGANT |
| - Biophysique médicale B | BRU |
| - Chimie biologique | VALDIGUIE P. |
| - Electro radiologie | MARQUES |
| - Embryologie générale | BROUSSY J. |
| - Hématologie | RUFFIE J. |
| - Histologie | BIMES |
| - Hydrologie thérapeutique et climatologie | DARNAUD |
| - Hygiène et médecine sociale | MONNIER |
| - Immunologie | DUCOS |
| - Médecine légale et médecine du travail | PLANQUES |
| - Pathologie chirurgicale | DAMBRIN |
| - Pathologie générale et médecine expérimentale | SENDRAIL |
| - Pathologie médicale | RIBAUT |
| - Physiologie | LAPORTE Y. |
| - Physiologie appliquée et pharmacologie | BAISSET |
| - Sémiologie et clinique médicale | LAPORTE J. |
| - Thérapeutique | DARDENNE |

PROFESSEURS A TITRE PERSONNEL

| | |
|---|---|
| - Histologie et embryologie | MM. GUILHEM |
| - Anatomie pathologique | BOUISSOU |
| - Biochimie médicale | DOUSTE-BLAZY |
| - Histologie et embryologie | PLANEL |
| - Maladies infectieuses | ARMENGAUD |
| - Oto-Rhino-Laryngologie | CLAUX |
| - Pathologie médicale | BOULARD |
| - Physiologie | MONTASTRUC |
| - Physiologie | BESSOU |
| - Physique médicale | COMMANAY |
| - Pneumo-Phtisiologie | MIGUERES |

PROFESSEURS SANS CHAIRE

| | |
|---|---|
| - Anatomie pathologique | MM. FABRE J. |
| - Bactériologie parasitologie, virologie | Mme LARENG |
| - Biochimie médicale | VALDIGUIE P. |
| - Chirurgie générale | GEDEON |
| - Chirurgie générale | SARRAZIN |
| - Chirurgie thoracique et cardio-vasculaire | ESCHAPASSE |
| - Electro-radiologie | PONS |

| | |
|---|---|
| - Electro-radiologie | MM. ROULLEAU |
| - Médecine générale et thérapeutique | BOLLINELLI |
| - Ophtalmologie | DEODATI |
| - Pédiatrie | DALOUS |
| - Neuro-chirurgie | ESPAGNO J. |
| - Médecine générale et thérapeutique | SUC |
| - Pédiatrie | REGNIER |
| - Médecine générale | RIBET |

MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

| | |
|---|---|
| - Carcinologie | MM. ESTRADE |
| - Médecine générale et thérapeutique | BES |
| - Pathologie expérimentale | GLEIZES |
| - Médecine générale | ARLET J. |
| - Thérapeutique, réanimation médicale, rééducation fonctionnelle et hydrologie | SALVADOR M. |
| - Radiologie | COMBES P. |
| - Pneumo-phtisiologie | ALBAREDE J. L. |
| - Pédiatrie génétique médicale | ROCHICCIOLI P. |
| - Chirurgie générale | ESCAT J.<br>COSTAGLIOLA |
| - Orthopédie, traumatologie, chirurgie plastique et reconstructive | UTHEZA G. |
| - Urologie | PONTONNIER F. |
| - Histologie, embryologie, cytogénétique | SOLEILHAVOUP J.P |
| - Biophysique | GUIRAUD R. |
| - Physiologie | PAGES B. |
| - Parasitologie | LARROUY |
| - Immunologie hématologie maladies du sang | BIERME R. |
| - Anatomie et organogénèse | JUSKIEWENSKI S. |

AGREGES

| | |
|---|---|
| - Médecine générale | MM. CALAZEL |
| - Médecine générale | RASCOL |
| - Médecine générale | LE TALLEC |
| - Chirurgie générale | GAUBERT |
| - Dermato et syphiligraphie | DUPRE |
| - Hydrologie | DENARD |
| - Médecine légale | GREZES-RUEFF |
| - Neurologie et psychiatrie | GAYREL |
| - Obstétrique | ESPAGNO G. |
| - Ophtalmologie | BEC |

## AGREGES LIBRES

| | |
|---|---|
| - Chirurgie générale | MM. SOUQUET |
| - Pathologie chirurgicale | DIEULAFE |

## MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIE

| | |
|---|---|
| - Psychiatrie | M. LABOUCARIE |

## SECTION PHARMACIE

| | |
|---|---|
| - Botanique et cryptogamie | N |
| - Chimie analytique | PITET |
| - Toxicologie, hygiène industrielle et hydrologie | BOURBON |
| - Chimie pharmaceutique | BLANC |
| - Microbiologie | BREUILLAUD |
| - Pharmacie chimique et pharmacodynamie | CAUJOLLE |
| - Pharmacie galénique et matière médicale | STANISLAS |
| - Physiologie, zoologie et parasitologie pharmaceutique | ROUX |

## PROFESSEURS A TITRE PERSONNEL

| | |
|---|---|
| - Pharmacie | MM. COUTURIER |
| - Sciences naturelles | Mme CAUJOLLE |
| - Toxicologie | BROUSSY G. |

## PROFESSEURS SANS CHAIRE

| | |
|---|---|
| - Chimie organique | M. BERTRAND |
| - Zoologie | GAYREL |

## MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

| | |
|---|---|
| - Botanique | Mme LASCOMBES |
| - Microbiologie | MM. MICHEL G. |
| - Pharmacodynamie | CROS J. |
| - Physiologie | DUMAS J. C. |
| - Pharmacie galénique | ROUFFIAC R. |
| - Chimie biologique | SOULA G. |
| - Toxicologie | MALBOSC R. |

## PERSONNEL ADMINISTRATIF

Secrétaire principal : Monsieur J. ROCHE

La Faculté déclare n'être pas responsable des opinions émises par les candidats (délibération en date du 12 mai 1891).

A notre Président de Thèse :

M. le Professeur L. DOUSTE-BLAZY

Professeur de Biochimie Médicale

À notre Jury de Thèse

M. le Professeur P. BOURBON

Professeur de Toxicologie, Hygiène industrielle
et Hydrologie

M. le Professeur J. BREUILLAUD

Professeur de Microbiologie

M. le Professeur L. DOUSTE-BLAZY

Professeur de Biochimie Médicale

M. le Professeur G. SOULA

Maître de Conférences agrégé
de Chimie Biologique

A la mémoire de mon beau-père

A mes parents

A ma belle-mère

A mon mari

A mes enfants

A toute ma famille

en gage d'amour et d'affection.

# AVANT PROPOS

Au terme de ce travail, il nous est agréable de témoigner notre respectueuse reconnaissance à notre Jury de Thèse et aux Maîtres dont nous avons reçu l'enseignement.

Nous remercions M. le Professeur DOUSTE-BLAZY de l'accueil qu'il nous a réservé dans son service ; il nous a fait profiter, durant la réalisation de ce travail, de sa grande expérience et de ses judicieux conseils.

Ses contacts avec nous ont toujours été empreints d'une grande simplicité et d'une amicale gentillesse que nous avons grandement appréciées.

Nous le remercions du très grand honneur qu'il nous a fait en acceptant de présider cette thèse.

M. le Professeur BREUILLAUD a été notre Maître en Microbiologie ; nous avons pu prendre conscience de la précision et de la clarté de son enseignement.

Nous le remercions avec respect d'avoir accepté d'être de nos juges.

Nous remercions bien sincèrement M. le Professeur BOURBON ; nous avons pu apprécier la rigueur de son enseignement et sommes sensibles à l'intérêt qu'il veut bien nous accorder en acceptant de siéger à notre Jury de Thèse.

Une grande part de notre reconnaissance s'adresse à M. le Professeur SOULA.

Ce travail est en grande partie son oeuvre ; il nous l'a inspiré, il a suivi pas à pas son évolution.

Son sens de la recherche, sa rigueur scientifique, sa cordiale sympathie, sont pour nous, à tous les instants, le meilleur réconfort.

Ce travail est pour nous l'occasion de lui affirmer notre sincère attachement.

Nous remercions vivement M. le Professeur CROS pour sa participation à notre Jury de Thèse.

Nos remerciements vont à M. Y. MAURY, assistant en biochimie qui nous a assuré sa collaboration dans l'élaboration de cette thèse et à tous nos camarades du laboratoire de biochimie du Centre Anticancéreux qui nous ont témoigné leur sympathie.

Nous ne saurions oublier Mlle SAINT-SERNIN qui nous a apporté un concours précieux et dévoué.

Nous remercions enfin M. COURRECH dont les talents de photographe nous ont été si utiles.

# PLAN

INTRODUCTION.

PREMIERE PARTIE

TRAVAUX ANTERIEURS

I - COMPOSITION CHIMIQUE.

1 - Glucides.
2 - Protéines.
3 - Enzymes.
4 - Lipides.

a) Lipides totaux.
b) Lipides neutres.
c) Phospholipides.
d) Acides gras.
e) Sphingolipides.

II - ROLE DES LIPIDES RENAUX.

III- METABOLISME.

1 - Acides gras et lipides neutres.
2 - Phospholipides.
3 - Sphingolipides.

DEUXIEME PARTIE

RECHERCHES PERSONNELLES

CHAPITRE I - METHODES D'ANALYSES.

I - PRELEVEMENT ET DISSECTION.

II - EXTRACTION DES LIPIDES.

III- PURIFICATION DES EXTRAITS.

IV - METHODES D'ANALYSES PROPREMENT DITES.

A - METHODES DE FRACTIONNEMENT.

1 - Chromatographie sur colonne.

2 - Chromatographie sur couche mince.

a) Phospholipides.

b) Lipides neutres.

3 - Réactifs d'identification des lipides.

4 - Chromatographie en phase gazeuse.

B - METHODES DE DOSAGE CHIMIQUE.

1 - Dosage du phosphore.

2 - Dosage du cholestérol.

C - ETUDE ISOTOPIQUE.

1 - Technique d'incorporation de $^{32}P$.

2 - Technique de comptage.

CHAPITRE II - RESULTATS.

I - ETUDE ANALYTIQUE.

A - FRACTIONNEMENT DES LIPIDES.

1 - Sur colonne d'acide silicique.

2 - Par chromatographie en couche mince.

a) Lipides neutres.

b) Phospholipides.

- monodimensionnelle,
- bidimensionnelle.

B - DOSAGES CHIMIQUES.

1 - Cholestérol.

2 - Phospholipides.

C - COMPOSITION EN ACIDES GRAS.

1 - Acides gras libres.

2 - Triglycérides.

3 - Phospholipides.

a) Phospholipides totaux.

b) Glycérophospholipides.

c) Sphingomyélines.

II - ETUDE METABOLIQUE.

1 - Autoradiogrammes.

2 - Mesures des activités spécifiques.

CHAPITRE III - DISCUSSION DES RESULTATS.

CONCLUSIONS.

BIBLIOGRAPHIE.

# INTRODUCTION

Il nous a semblé intéressant d'aborder l'étude des lipides du tissu rénal, un certain nombre de divergences apparaissent dans les travaux qui lui ont été consacrés.

Nous l'avons abordée sous l'angle analytique en utilisant des techniques nouvelles de chromatographie sur colonne d'acide silicique et sur couche mince ainsi que de chromatographie en phase gazeuse des acides gras.

Elles nous ont permis d'étudier la composition lipidique des zones corticale et médullaire du rein humain et d'y préciser tout particulièrement la teneur en lysophosphatidylcholines et en cardiolipides.

L'aspect métabolique des phospholipides étant mal connu, nous étudions l'incorporation du radiophosphore dans le rein de rat et précisons en fonction du temps les activités spécifiques des principaux phospholipides.

Ces éléments nous permettront d'aborder ultérieurement l'étude de la pathologie humaine de ce tissu.

PREMIERE PARTIE

# Travaux Antérieurs

# I _ COMPOSITION CHIMIQUE

## 1 _ Glucides

Peu de travaux ont été consacrés à l'étude des glucides du rein.

LANGE et MARKOWITZ ( 1 ), DISCHE et coll. ( 2 ) décèlent dans le rein humain essentiellement du glucose et du galactose, des traces de mannose et de fucose et des osamines.

La composition chimique de la membrane basale glomérulaire est définie par DISCHE ( 2 ) dans le tableau 1 et exprimée en mg pour 100 mg de tissu.

| | |
|---|---|
| Hexoses | 5,6 |
| Fucose | 0,58 |
| Hexosamines | 0,95 |
| Acides sialiques | 0,55 |
| Phosphore | 1,13 |
| Protéines | 84 |
| Acides aminés | 7,2 |

TABLEAU 1

Teneur en protéines, acides aminés, composés phosphorés et glucides du rein humain.

Une grande partie de ces composés se trouve dans le rein, sous forme de glucoprotéines dont nous envisagerons plus loin l'étude.

## 2 _ Proteines

Parmi les recherches également peu nombreuses effectuées sur l'étude des protéines du tissu rénal, nous pouvons citer les tentatives d'analyse électrophorétique des protéines hydrosolubles du rein.

A la suite des travaux de SCHWARZMAN ( 3 ), de GROUCHY ( 4 ), de

BERNSOHN ( 5 ) sur l'électrophorèse des protéines tissulaires en gel d'amidon, DEBRAY-SACHS a appliqué cette technique au tissu rénal ( 6 ).

La comparaison des diagrammes obtenus à partir du sérum, du sang et du rein, indique que seule la zone cathodique comporte de façon spécifique, des traits propres au broyat de rein et absents dans les préparations de sérum et de sang total.

SOTIROV ( 7 ) définit les fractions électrophorétiques de protéines rénales de quelques espèces animales (souris, rats, cobayes, lapins) :

- préalbumines,
- albumines,
- $\alpha$ globulines séparées en trois ou quatre fractions,
- $\beta$ globulines séparées en deux ou trois fractions,
- $\gamma$ globulines divisées en trois ou cinq fractions.

Le rapport $\frac{Al}{Gl}$ est très bas.

Le pourcentage des $\alpha$ globulines représente plus du tiers des protéines totales de l'organe.

Il y a moins de $\beta$ que d'$\alpha$ globulines et les $\gamma$ sont présentes en très petite quantité.

Le taux des préalbumines, le pourcentage et la mobilité électrophorétique des autres fractions diffèrent suivant l'animal étudié.

LANGE et MARKOWITZ ( 1 ), DISCHE et coll. ( 2 ) citent la présence d'acides aminés libres : acide aspartique, acide glutamique, glycocolle, hydroxylysine et hydroxyproline ; ils notent un pourcentage élevé pour ce dernier acide aminé, confirmé dans les travaux de BRUCKHAUSER et MERKER ( 8 ).

Quelques auteurs se sont attachés à isoler des mucopolysaccharides et glycosphingosides ( 9 ) ( 10 ).

ALLALOUF et SHARON ( 11 ) séparent deux fractions de polysaccharides acides dans les reins de rat :

- la fraction I consiste surtout en un polysaccharide de structure voisine de celle de l'héparine, avec de petites quantités d'acide hyaluronique et de protéines,
- la fraction II contient : protéines, glucosamine, sulfate et galactose.

Ces fractions contiennent dans leur complexe moléculaire, de petites quantités de galactosamine. A la suite de travaux ultérieurs, ALLALOUF ( 12 ) attribue à la fraction I des propriétés anticoagulantes. PINTER ( 13 ) pense que les mucopolysaccharides acides, surtout abondants dans la zone médullaire, pourraient intervenir dans le processus de concentration des urines.

## 3 - Enzymes

Le tissu rénal est d'une richesse particulière en enzymes.

L'étude des enzymes de tranches de tissu ou de broyats a démontré l'existence de très nombreuses activités anaboliques et cataboliques dans la plupart des grandes chaînes métaboliques.

Le tissu rénal comporte des enzymes agissant dans toutes les étapes de la désamination, de la transamination et de la décarboxylation des amino-acides ; le parenchyme rénal peut réaliser aussi bien la dégradation complète des glucides que leur synthèse ; la plupart des systèmes enzymatiques intervenant dans le catabolisme et l'anabolisme des lipides ont été constatés au niveau des reins.

Sur cet ensemble complexe, divers travaux de synthèse ont été publiés aussi bien sur les activités enzymatiques du rein normal ( 14 ) ( 15 ) que sur celles des reins pathologiques ( 16 ).

On a tenté de préciser la topographie de ces activités enzymatiques par les méthodes d'histoenzymologie, en s'aidant au besoin de la microdissection du néphron ( 17 ) ( 18 ). ROYER ( 19 ) groupe certains enzymes dans le tableau suivant :

| | Glomérule | Tube proximal | Tube distal |
|---|---|---|---|
| Anhydrase carbonique | 0 | + | +++ |
| Phosphatase alcaline | $\frac{+}{-}$ | +++ | + |
| Transaminase glutamino-pyruvique | $\frac{+}{-}$ | ++ | ++ |
| Transaminase glutamino-oxalacétique | $\frac{+}{-}$ | ++ | ++ |
| Malicodéhydrogénase | 0 | ++ | ++ |
| Lacticodéhydrogénase | + | ++ | ++ |

TABLEAU 2

Principales activités enzymatiques des diverses parties du rein.

Dans son étude histochimique enzymatique du néphron du rat, JASMIN ( 20 ) étudie treize enzymes oxydatifs et hydrolytiques. Excepté l'hydroxybutyrique déshydrogénase, le tube proximal présente une activité optimale alors que la portion mince du tube de Henlé révèle une activité minimale ;

dans cette portion du néphron seule la lacticodéshydrogénase est démontrée.

Une activité intense des enzymes oxydatifs est trouvée dans la portion ascendante de Henlé et du tube distal alors que les enzymes hydrolytiques ont une activité beaucoup plus faible et même absente. Les différences sont notables pour la 5 nucléotidase et les estérases non spécifiques.

Dans le tube collecteur, les activités enzymatiques sont assez faibles, la plus grande activité est observée pour les succino et lacticodéshydrogénases et la phosphatase acide.

La phosphatase acide et la phosphatase alcaline du rein ont fait l'objet de nombreux travaux. Leur activité et leur localisation sont très différentes l'une de l'autre. La phosphatase alcaline se localise au niveau des tubes contournés proximaux, la phosphatase acide dans les lysosomes de toutes les parties du tubule : PASCALE et PULILO ( 21 ).

Ces deux enzymes revêtent une importance capitale dans le métabolisme général et dans la réabsorption tubulaire du glucose. Leur détermination présente par ailleurs une valeur de diagnostic dans les néphropathies.

Un enzyme important à signaler est la rénine : enzyme protéolytique, d'origine spécifiquement rénale. Il a pour but de convertir l'hypertensinogène sanguin en hypertensine.

Il ressort des travaux expérimentaux de REGOLI et coll. ( 22 ) que sa sécrétion par le rein est liée à l'élévation de la pression sanguine.

Un inhibiteur de cet enzyme a été isolé du rein de chien par SUBHA SEN et coll. ( 23 ) qui en déterminent la structure et l'identifient à un phospholipide voisin de la phosphatidylsérine, différant de celle-ci dans la composition en acides gras et la structure de l'acide aminé.

## 4 - Lipides

Les données sur la composition des lipides du rein sont encore bien faibles par rapport aux études faites sur d'autres organes en particulier le cerveau et le foie.

### a) LIPIDES TOTAUX.

FEWSTER et coll. ( 24 ) se sont intéressés à l'étude comparative des lipides de reins de rats soumis à un régime normal et de rats recevant une nourriture déficiente en choline ; les reins de ces animaux deviennent, avec la

durée du régime, de plus en plus hémorragiques et présentent des variations dans leur composition lipidique : les lipides totaux et les phospholipides diminuent alors que les lipides neutres sont deux fois plus élevés dans les reins lésés que dans les reins normaux : ce même ordre de variation est retrouvé par LEVY ( 25 ) dans des cas de syndrome néphrotique provoqué chez des rats traités à l'aminonucléoside. MORGAN et coll. ( 26 ) la même année se sont attachés à l'étude des lipides des zones corticale et médullaire de reins de lapins.

Récemment, la composition lipidique des reins de quelques espèces (rat, boeuf, souris, homme) a été rapportée par ROUSER et coll. ( 27 ).

Ces différents résultats sont réunis dans le tableau 3.

| | FEWSTER | MORGAN | | ROUSER | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | Cortex | Médulla | | |
| | Rat | Lapin | | Rat | Homme |
| Lipides totaux (a) | 4,32 ± 0,19 | 3,32 | 2,08 | 4,07 ± 0,7 | 2,12 - 5,26 |
| Phospholipides (a) | 3,72 ± 0,29 | 2,93 | 1,42 | 2,65 ± 0,15 (b) | 2,43 - 1,09 |
| Lipides neutres (a) | 0,60 ± 0,05 | 0,51 | 0,61 | | |

(a) en pourcentage de poids frais de tissu rénal.

(b) en milligrammes de P pour 100 mg de lipides.

TABLEAU 3

Teneur en lipides totaux, lipides neutres et phospholipides de quelques animaux selon divers auteurs.

b) LIPIDES NEUTRES.

GOLD ( 28 ) cite pour les lipides neutres de reins de chiens un pourcentage de triglycérides quatre fois plus élevé dans la zone médullaire que dans la zone corticale alors que MORGAN et coll. ( 26 ) pour des reins de lapins n'en trouvent que deux fois plus.

Quant au cholestérol, il constitue sous forme libre environ 80 p.100 des lipides neutres selon LEVY ( 25 ), MORGAN et coll. ( 26 ).

c) PHOSPHOLIPIDES

En 1958, MARINETTI et coll. ( 29 ) dressaient un tableau de pourcentages de divers phospholipides d'organes de rats (foie, coeur, rein etc ...) ; sur le même animal, ROUSER et coll. ( 27 ) citent des valeurs un peu différentes. MORGAN et coll. ( 26 ) donnent la composition des différents phospholipides des zones corticale et médullaire de reins de lapins et quelques années plus tard, TINKER et HANAHAN ( 30 ) dans un travail sur l'incorporation de $^{32}P$ dans des coupes de reins de lapins, déterminent le taux des principaux phospholipides.

Ces résultats sont rassemblés dans le tableau suivant :

| | MARINETTI (rat) | TINKER (lapin) | ROUSER (rat) | ROUSER (homme) | MORGAN (lapin) Cortex | MORGAN (lapin) Médulla |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Lysophosphatidylcholines | 4,0 | 0,7 | 0,9 | 3,6 | 0,7 | 2,4 |
| Sphingomyélines | 20,8 | 15,2 | 12,2 | 12,9 | 14,6 | 9,5 |
| Phosphatidylsérines | 12,0 | 19,3 | 7,0 | 6,3 | 4,7 | 8,2 |
| Phosphatidylinositol | | | 5,8 | 5,4 | 5,0 | 5,2 |
| Phosphatidylcholines | 33,7 | 32,5 | 34,2 | 31,6 | 30,1 | 40,7 |
| Phosphatidyléthanolamines | 17,6 | 29,7 | 27,3 | 26,5 | 21,6 | 25,0 |
| Cardiolipides | 5,4 | 5,6 | 6,5 | 4,4 | 4,0 | 8,2 |

TABLEAU 4

Taux des phospholipides du rein de quelques mammifères selon divers auteurs

Les phosphatidylcholines représentent dans toutes les espèces animales étudiées (rat, lapin, homme) le phospholipide majeur et d'une valeur très constante.

Le taux des cardiolipides varie d'une espèce à l'autre de 5,4 à 8,2 p. 100.

GETZ et coll. ( 31 ) analysent les phospholipides des fractions subcellulaires de divers organes de mouton ; le rein de mouton contient moins de phosphatidylcholines que le foie du même animal, par contre davantage de plasmalogènes surtout à éthanolamine.

La composition phospholipidique des mitochondries diffère de celle de l'homogénat d'organe, contenant davantage de phosphatidyléthanolamines, de polyglycérolphosphatides et moins de sphingomyélines.

Le rapport phosphatidyléthanolamines/phosphatidylcholines est de 0,45 dans les mitochondries, de 0,37 dans les microsomes.

Les microsomes contiennent très peu de polyglycérolphosphatide , ils sont par contre très riches en sphingomyélines.

d) ACIDES GRAS

Chez le rat, selon BURNS et ELWOOD ( 32 ) les acides gras libres comprennent essentiellement les acides palmitique, stéarique et oléique.

Ces acides sont retrouvés par FEWSTER et coll. ( 24 ) dans les lipides totaux, les lipides neutres et les phospholipides à côté de l'acide linoléique pour les lipides neutres et des acides linoléique et arachidonique pour les phospholipides.

Parmi les lipides neutres du tissu rénal de rat, LEVY ( 25 ) analyse les acides gras des triglycérides et du cholestérol estérifié et confirme qualitativement les recherches de FEWSTER et coll. ( 24 ). GOLD ( 28 ) analyse séparément les acides gras des phospholipides des zones corticale et médullaire de reins de chiens ; il y décèle des proportions équivalentes d'acides palmitique et arachidonique et par ailleurs des acides stéarique, oléique et linoléique en plus faible quantité.

Un travail important est effectué par KUKSIS et coll. ( 33 ) sur l'analyse des acides gras des phosphatidylcholines de reins de rat : acides palmitique, stéarique, oléique, linoléique et arachidonique sont les acides gras majeurs avec des pourcentages très faibles d'acides à 22 atomes de C, mais l'originalité de son travail, est de séparer diverses espèces moléculaires de phosphatidylcholines se distinguant les unes des autres par la composition des deux acides gras.

Cet auteur détermine leur position sur les carbones 1 et 2 du glycérol et leurs pourcentages sur ces deux positions.

Les résultats sont rassemblés dans le tableau 5.

GLENDE et CORNATZER ( 34 ) étudient la composition des acides gras des phospholipides mitochondriaux de quelques organes de rat (foie, rein, coeur et rate) ; l'acide stéarique est le composé majeur dans la fraction phosphatidylinositol ; les pourcentages d'acides palmitique et linoléique sont plus

| Acides gras | libres (1) | Lipides totaux (2) | Lipides neutres (3) | | (2) | Phospholipides (4) | | (2) | Phosphatidylcholines (5) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | CE | TG | Totaux | Cortex | Médulla | Totaux | |
| 12 : 0 | 1,1 | | | | | | | | |
| 14 : 0 | 0,7 | | 7,4 | - | | 0,4 | 0,1 | | 0,5 |
| 15 : 0 | 0,7 | | - | - | | | | | |
| 16 : 0 | 36,0 | 24,1 ± 0,2 | 37,9 | 32,3 | 38,0 ± 1,9 | 27,3 | 25,3 | 26,8 ± 0,5 | 37,7 |
| 16 : 1 | 1,8 | - | 22,7 | 10,6 | 6,1 ± 0,4 | 1,5 | 1,0 | - | 2,8 |
| 17 : 0 | 1,1 | - | - | - | - | - | | - | |
| 18 : 0 | 33,0 | 19,8 ± 0,4 | 9,3 | 18,7 | 10,0 ± 1,1 | 11,3 | 13,2 | 22,5 ± 0,4 | 12,4 |
| 18 : 1 | 14,0 | 14,1 ± 0,2 | 17,8 | 23,6 | 22,9 ± 1,2 | 16,1 | 15,4 | 13,9 ± 0,8 | 14,1 |
| 18 : 2 | 7,1 | 15,8 ± 0,4 | 5,1 | 12,5 | 11,3 ± 1,0 | 14,6 | 14,4 | 14,5 ± 0,5 | 14,5 |
| 18 : 3 | | | | | | 0,3 | 0,6 | | |
| 20 : 1 | | | | | | | | | 0,9 |
| 20 : 2 | | | | | | | | | 0,3 |
| 20 : 3 | | | | | | 0,7 | 1,0 | | 1,2 |
| 20 : 4 | | 26,3 ± 0,5 | | | 8,6 ± 1,0 | 22,7 | 24,2 | 22,3 ± 0,7 | 10,6 |
| 20 : 5 | | | | | | | | | 1,4 |
| 22 : 5 | | | | | | | | | 0,6 |
| 22 : 6 | | | | | | | | | 3,0 |

1 - BURNS (rat), 2 - FEWSTER (rat), 3 - LEVY (rat), 4 - GOLD (chien), 5 - KUKSIS (rat).
CE = cholestérol estérifié, TG = triglycérides,

TABLEAU 5

Pourcentage en acides gras libres et en acides gras estérifiés de quelques fractions lipidiques selon divers auteurs (Les pourcentages ne tiennent pas compte des acides gras non identifiés).

importants dans les phosphatidylcholines que dans les phosphatidyléthanolamines qui par contre sont plus riches en acides stéarique et arachidonique. Ces auteurs analysent en même temps la variation des taux d'acides gras en fonction de l'âge de l'animal.

e) SPHINGOLIPIDES

Ces lipides ont été surtout étudiés dans le tissu cérébral ; cependant en 1925, LANDSTEINER et LEVENE ( 35 ) notaient la présence de sulfatides dans le tissu rénal.
GREEN et ROBINSON ( 36 ) les isolent de reins de rat et en étudient la distribution dans les fractions subcellulaires, ils décèlent un pourcentage élevé de ces composés dans les noyaux et les microsomes.

| | |
|---|---|
| Débris + noyaux | 38 % |
| Mitochondries | 13 % |
| Microsomes | 38 % |
| Surnageant | 11 % |

TABLEAU 6

Répartition des sulfatides dans les diverses fractions subcellulaires du rein de rat selon GREEN et ROBINSON ( 36 ).

SVENNERHOLM ( 37 ) note des concentrations très différentes de sphingogalactolipides (cérébrosides + sulfatides) dans le cortex cérébral, la substance blanche, le rein et la rate d'un enfant de deux mois (0,5 % du poids sec dans le rein contre 1,5 % dans le cerveau).

Les sulfatides du rein humain se composent selon MARTENSSON ( 38 ) de deux fractions différant par la structure de la copule glucidique : un céramide monohexoside sulfate identique au sulfatide du tissu cérébral, et un céramide dihexoside sulfate, dérivé du lactose portant un groupement sulfate sur le carbone 3 du galactose ; cette deuxième fraction représente 25 à 30 p. 100 des sulfatides totaux de l'organe. Ce composé est également isolé du rein humain et sa structure définie par STOFFYN et coll. ( 39 ), confirmant les travaux de MARTENSSON ( 38 ). Déjà AUSTIN (40, 41) avait signalé la présence de ces sulfatides dans les reins de malades atteints de leucodystrophie

métachromatique, sphingolipidose héréditaire, dans laquelle ces composés s'accumulent anormalement dans les tissus nerveux, rénaux, hépatiques et autres.

Les glycolipides ont été isolés du rein de rat par KAWANAMI ( 42 ) ; cet auteur décrit des glycolipides majeurs :

Céramide monohexoside ou cérébroside,
Céramide monohexoside sulfate ou sulfatide,
Globoside ou cytolipide R.

des glycolipides mineurs en proportions très faibles ou à l'état de traces :

Céramide dihexoside,
Céramide trihexoside,
Hématoside.

Le rein se compose de 10 à 15 mg de sulfatides et de 4 à 6 mg de cérébrosides pour 100 grammes de tissu frais. Ce pourcentage élevé de sulfatides fait supposer à ces auteurs un rôle dans le métabolisme électrophorétique rénal.

L'analyse des acides gras également faite par MARTENSSON sur le rein humain ( 38 ) fournit les données suivantes (Tableaux 7 et 8).

Les composés majeurs à chaîne normale sont les acides béhénique, lignocérique et nervonique. Des acides gras hydroxylés sont également identifiés comportant 22, 23 et 24 atomes de carbone.

Les cérébrosides rénaux consistent en glucosyl et galactosyl céramide dans les proportions de 3 à 1 ; les sulfatides contiennent uniquement du galactose 3-sulfate ; les bases à longue chaîne : $C_{18}$ sphingosine, $C_{17}$ et $C_{18}$ dihydrosphingosines sont présentes avec une prédominance de $C_{18}$ sphingosine.

Ces travaux sont en accord avec ceux de MAKITA ( 43 ), MAKITA et YAMAKAWA ( 44 ) qui précisent la composition et la structure des glycolipides du rein humain.

Les gangliosides du tissu rénal ont été isolés, analysés et leur structure déterminée par quelques auteurs ; ainsi WHERRET et CUMMINGS ( 45 ) définissent dans différents organes de cobaye (cerveau, foie, rein etc...) trois composés majeurs formant le complexe gangliosidique et citent le rôle dominant des gangliosides apolaires.

PURO et coll. ( 46 ) étudient qualitativement et quantitativement les gangliosides de divers tissus de rat, lapin et cobaye ; ils remarquent des différences dans leur composition et leur migration selon les organes analysés. La structure de cinq gangliosides purifiés de reins de boeuf est donnée par PURO ( 47 ), PURO et KERANEN ( 48 ). Ces auteurs définissent trois composés

| Acides gras à chaîne normale | Cérébrosides | Sulfatides |
|---|---|---|
| 16 : 0 | 5 | 3 |
| 18 : 0 | 3 | 2 |
| 20 : 0 | 8 | 5 |
| 21 : 0 | 1 | 2 |
| 22 : 0 | 23 | 24 |
| 23 : 0 | 8 | 12 |
| 24 : 0<br>24 : 1 | 52 | 52 |

TABLEAU 7

Pourcentage des acides gras à chaîne normale
des cérébrosides et des sulfatides du rein de rat selon KAWANAMI ( 42 ).

| Acides gras à chaîne hydroxylée | Cérébrosides | Sulfatides |
|---|---|---|
| 20 h | 7 | 1 |
| 22 h | 34 | 23 |
| 23 h | 26 | 28 |
| 24 h | 33 | 48 |

TABLEAU 8

Pourcentages des acides gras à chaîne hydroxylée
des cérébrosides et des sulfatides du rein de rat selon KAWANAMI ( 42 ).

principaux comme étant diverses céramides contenant des quantités équimoléculaires de glucose, de galactose et de l'acide N acétyl ou N glucolyl neuraminique ; deux gangliosides mineurs renferment : acide N acétyl neuraminique, galactose, glucose et hexosamine dans le rapport 2 : 2 : 1 : 1. Ces gangliosides rénaux comprennent surtout les acides palmitique (6 à 14 p. 100), stéarique (14 à 34 p. 100), béhénique (8 à 13 p. 100) et lignocérique (14 à 22 p. 100) ; ils renferment aussi des $\alpha$ hydroxyacides : 10 à 33 p. 100 des acides gras totaux comprenant essentiellement : $C_{20} : 0$ (9 à 14 p. 100), $C_{22} : 0$ (42 à 45 p. 100), $C_{23} : 0$ (14 à 18 p. 100) et $C_{24} : 0$ (10 à 13 p. 100). Les bases à longue chaîne qui prédominent dans les trois gangliosides majeurs sont : $C_{18}$ sphingosine normale, $C_{18}$ trihydrosphingosine, $C_{18}$ dihydrosphingosine et $C_{20}$ trihydrosphingosine ; une quantité faible de sphingosines à chaîne branchée y est décelée.

Le tissu rénal est selon CARTER ( 49 ) le seul possédant simultanément les sphingosine normale, dihydrosphingosine et phytosphingosine dans les cérébrosides alors que la fraction sphingomyélinique ne contient pas de phytosphingosine.

Ce résultat est infirmé par KARLSSON et coll. ( 50 ). Ces auteurs étudiant la répartition des bases à longue chaîne carbonée dans le rein humain et le rein de boeuf signalent l'existence dans les sphingomyélines du cortex, de la médulla et des papilles de sphingosine normale en $C_{18}$, $C_{18}$ trihydrosphingosine ou phytosphingosine, $C_{20}$ trihydrosphingosine et $C_{18}$ dihydrosphingosine.

Les bases trihydroxylées sont surtout abondantes dans la médulla et les papilles ; on y rencontre aussi des traces de sphingosines à chaîne branchée.

La présence de phytosphingosine dans les sphingolipides du rein a été également rapportée par MICHALEC et KOLMAN ( 51 ), BARENHOLZ et GATT ( 52 ).

Etudiant la répartition des bases à longue chaîne dans les glycolipides du rein humain, KARLSSON et MARTENSSON ( 53 ) montrent que la phytosphingosine constitue la moitié environ de celles-ci alors qu'elle est absente des cérébrosides du cerveau. Elle se localise essentiellement dans les céramide monoglucoside, céramide monogalactoside et céramide galactoside sulfate.

# II _ ROLE DES LIPIDES RENAUX

Les lipides et plus particulièrement les phospholipides paraissent intervenir directement dans les principales fonctions métaboliques du rein. Quelques travaux démontrent leur participation aux processus de filtration glomérulaire et de réabsorption tubulaire.

DEIBERT et JUCHEMS ( 54 ) administrant des préparations de phosphatidylcholines à des malades hypertendus et présentant une néphrite glomérulaire, observent une diminution de la créatinémie et une élévation de 20 p. 100 de la clearance à la créatine. Ceci démontre une action directe des phospholipides sur les membranes des glomérules ; les phosphatidylcholines paraissent avoir une action significative.

Le rôle des phospholipides dans les mécanismes actifs de transport des ions a été également étudié.

MALILA et coll. ( 55 ) invoquent l'importance des phospholipides des membranes des tubes rénaux dans le transport du rubidium.

Par ailleurs, TINKER et coll. ( 56 ) étudiant chez l'animal l'influence de la diphénylhydantoïne notent au niveau du rein des modifications de l'incorporation de $^{32}P$ dans les phospholipides liées à des variations du mouvement du potassium, du sodium et du chlore.

Les phospholipides paraissent directement impliqués dans ce transport actif notamment les acides phosphatidiques et peut-être les cardiolipides.

HOKIN et HOKIN (57, 58, 59, 60) ont souligné l'importance dans le transport des cations monovalents, d'une voie métabolique faisant intervenir les inositolphosphatides et les acides phosphatidiques.

Le mécanisme de transport des ions implique l'existence d'une combinaison transitoire. De nombreuses hypothèses ont été émises au sujet de ce transporteur.

HOKIN et HOKIN (57, 58) ont identifié ce transporteur à un "cycle de l'acide phosphatidique". L'acide phosphatidique salifié est hydrolysé par l'acide phosphatidique phosphatase en 1-2 diglycéride et phosphate, ce qui libère les ions ; l'acide phosphatidique est resynthétisé à partir du diglycéride par une diglycéride-kinase en présence d'ATP. Diglycéride et phosphatidate de sodium migrent librement dans la membrane.

Si la théorie de HOKIN et HOKIN était vérifiée, la quantité d'ions sodium transportés serait égale à la quantité d'ATP synthétisé dans le même temps.

LASSEN et coll. ( 61 ) ont montré qu'il n'en était pas ainsi.

HOKIN et HOKIN (62, 63) ont ensuite modifié leur théorie et envisagé comme système de transport l'existence d'une lipoprotéine dont l'acide phosphatidique pourrait transporter plus de deux ions.

Selon ces auteurs, elle interviendrait aussi dans le transport du potassium ( 59 ).

Des travaux de LUBOCHINSKY et coll. (64, 65) sur des bactéries, ont infirmé la théorie de HOKIN car lorsqu'il y a accroissement de la quantité des ions transportés, le renouvellement de l'acide phosphatidique n'est pas augmenté.

OLSON ( 66 ) cite quelques observations qui tendent à exclure le rôle métabolique direct des phospholipides dans le transport des ions.

Dans un récent travail, STARER-MENDES et coll. ( 67 ) étudient le transport du potassium dans des coupes de cortex rénal de cobaye. Ils mesurent l'incorporation du $^{32}P$ dans l'acide phosphatidique et l'entrée du potassium ; ces deux paramètres sont également étudiés en présence d'ouabaïne qui inhibe l'entrée de $K^+$. En l'absence d'inhibiteurs, alors qu'il entre 900 nanomoles de $K^+$, 4 nanomoles de P sont incorporés dans l'acide phosphatidique ; en présence d'ouabaïne, l'entrée du $K^+$ diminue de 90 à 99 p.100, l'incorporation de P dans l'acide phosphatidique de 9 à 53 p. 100 seulement.

Ces résultats sont contraires à la théorie de HOKIN ( 59 ).

Par ailleurs, les cardiolipides, relativement abondants dans les mitochondries, jouent selon GETZ et coll. ( 31 ) en liaison avec la cytochrome-oxydase un rôle fondamental dans le transfert des électrons au niveau de la chaîne respiratoire.

Déjà MARINETTI et coll. (68, 69, 70) avançaient l'hypothèse que les cardiolipides pourraient être un accepteur de phosphate dans la phosphorylation oxydative ; le blocage de celle-ci par des inhibiteurs spécifiques diminue l'incorporation de $^{32}P$ ( 68 ). Cependant CONOVER et coll. ( 71 ) pensent que ces phospholipides ne jouent pas un rôle direct dans la phosphorylation oxydative .

Enfin, KAWANAMI ( 42 ) suppose de son côté que les sulfatides pourraient participer au métabolisme électrophorétique au niveau des tubes rénaux étant donné leur caractère électronégatif.

# III - METABOLISME

Le tissu rénal n'a pas reçu une investigation aussi intensive sur la lipogénèse que le tissu hépatique.

Depuis longtemps, on soupçonne une dégradation des lipides au cours de la traversée rénale (72, 73, 74) et l'on sait que le parenchyme rénal est riche en enzymes estérasiques (75, 76) ; en outre le sort subi par les lipides plasmatiques au cours des néphropathies ne serait pas celui observé chez les sujets normaux ( 77 ).

Le rein intervient très vraisemblablement sur le métabolisme des lipides mais on ignore encore le mécanisme de son action.

## 1 - Acides gras et lipides neutres

Les études de CHERNICK et coll. ( 78 ) ont montré que des coupes de reins de rat peuvent synthétiser les acides gras et le cholestérol à partir du glucose et de l'acétate ; ces résultats ont été confirmés par d'autres auteurs ( 79 ).

Le degré de synthèse in vitro des acides gras dans le rein, à partir de l'acétate a été évalué à 10 à 20 % de celui du foie ( 80 ) (Tableau 9).

| Temps d'incubation heures | Incorporation d'acétate 1-$^{14}$C dans les acides gras de foie par mg de protéines / Incorporation d'acétate 1-$^{14}$C dans les acides gras de rein par mg de protéines |
|---|---|
| 1/2 | 3,3 $\pm$ 0,95 |
| 1 | 4,5 $\pm$ 1,1 |
| 2 | 11,1 $\pm$ 3,0 |
| 3 | 7,8 $\pm$ 1,56 |

TABLEAU 9

Rapport d'incorporation d'acétate 1-$^{14}$C dans les acides gras du foie et du rein selon MASORO et PORTER ( 80 ).

Selon DIETSCHY et coll. ( 79 ), la synthèse du cholestérol dans le rein ne représente que 20 p. 100 environ de celle trouvée dans le foie.

La synthèse des acides gras et du cholestérol, in vitro dans des coupes de rein de rat incubés dans des conditions bien définies est suivie par l'incorporation de 1-$^{14}$C acétate ( 32 ) :

| | % de $^{14}$C acétate incorporé pour 100 mg tissu/heure | |
|---|---|---|
| | Rein | Foie |
| Acides gras | 0,04 ± 0,01 | 0,15 ± 0,04 |
| Cholestérol | 0,07 ± 0,05 | 1,9 ± 0,40 |

TABLEAU 10

Taux d'incorporation comparée d'acétate $^{14}$C dans les acides gras et le cholestérol pour le rein et le foie selon BURNS et ELWOOD ( 32 )

A la suite des travaux de HOHENLEITNER et SPITZER ( 81 ) mentionnant l'utilisation par le rein de chien, des acides gras libres circulant dans le sang et la différence de capacité métabolique entre le cortex et la médulla, GOLD ( 28 ) s'est intéressé à l'incorporation d'acides gras marqués dans les lipides du cortex et de la médulla du rein de chien.

Un mélange de 1-$^{14}$C palmitate de 9,10 H$^{3}$ oléate complexés à de l'albumine est infusé dans une veine de la patte du chien sans anesthésie pendant 90 minutes. Les chiens sont ensuite anesthésiés, saignés et les reins sont retirés pour l'analyse lipidique du cortex et de la médulla. Il ressort que le rein retient 0,25 % du palmitate injecté et 0,08 % de l'oléate.

La radioactivité est répartie en grande quantité dans la fraction phospholipidique et le reste est surtout incorporé dans les triglycérides. Le pourcentage de radioactivité est réparti comme suit pour les triglycérides : cortex 15 %, médulla 26 %. L'activité spécifique des acides palmitique et oléique est la plus forte dans le cortex aussi bien dans les triglycérides que dans les phospholipides.

## 2 - Phospholipides

MARINETTI ( 82 ) étudiant le métabolisme des phospholipides chez le rat, administre par voie sous-cutanée une solution de $^{32}P$ orthophosphate et étudie l'incorporation dans les fractions phospholipidiques de différents tissus de rat.

Dans le tissu rénal, l'incorporation est très grande dans les lécithines avec un maximum prononcé dix heures après l'injection, puis l'activité métabolique décroit assez rapidement pour rester stationnaire jusqu'à 96 heures où s'amorce une nouvelle augmentation.

Les phosphatidyléthanolamines et sphingomyélines montrent un pouvoir d'incorporation plus faible et stationnaire après 6 heures sauf pour les sphingomyélines qui semblent montrer une nouvelle activité après 48 heures.

Des résultats similaires ont été obtenus par d'autres auteurs : LEVIN et coll. ( 83 ),DAWSON ( 84 ).

Des études faites par TINKER et coll. ( 30 ) sur la vitesse d'incorporation de $^{32}P$ in vitro dans des coupes de cortex montrent que les phosphatidylcholines et phosphatidylinositols sont marqués très rapidement tandis que l'activité spécifique des cardiolipides est faite.

Ces mêmes auteurs étudiant le métabolisme phospholipidique du tissu rénal suivent l'incorporation in vitro de $^{32}P$ et d'acides gras marqués dans des coupes de cortex de rein de lapin ; le phosphore radioactif est incorporé fortement dans les phosphatidylinositols et phosphatidylcholines, faiblement dans les cardiolipides et sphingomyélines ; par ailleurs les acides palmitique 1-$^{14}C$ et linoléique 1-$^{14}C$ sont rapidement incorporés dans les lécithines.

WURSTER et COPENHAVER ( 85 ) s'attachant plus particulièrement à l'étude du métabolisme des phosphatidylcholines, analysent l'incorporation de $^{32}P$ dans ces phospholipides en fonction de l'insaturation de la molécule. Dans ce but, des coupes de rein de rat sont incubées avec du $^{32}P$ inorganique, les lécithines sont purifiées et séparées par ozonolyse réductrice en quatre fractions qui se différencient par leurs acides gras. Leurs proportions et leurs activités spécifiques sont rassemblées dans le tableau ci-après. Ces résultats montrent que la plus grande incorporation se fait dans les lécithines disaturées et la plus faible dans les lécithines $\alpha$ saturées $\beta$ insaturées.

Des recherches métaboliques réalisées davantage sur le plan clinique ou pathologique ont été entreprises par de nombreux auteurs.

NELSON ( 86 ) étudie l'effet de l'injection de thyroxine sur le

| Lécithines | % P | A.S. | Incorporation relative |
|---|---|---|---|
| disaturées | 12,2 | 290 | 2,65 |
| α saturées β insaturées | 27,2 | 109 | 1,00 |
| α insaturées β saturées | 39,8 | 183 | 1,67 |
| diinsaturées | 20,8 | 195 | 1,79 |

degré d'incorporation de $^{32}P$ dans les phospholipides mitochondriaux ; dans les cas d'hyperthyroïdisme, il oberve une augmentation des phosphatidyléthanolamines ; d'autre part, l'administration de propylthiouracile produit un hypothyroïdisme et également une diminution d'incorporation de $^{32}P$ dans les phosphatidylcholines et phosphatidyléthanolamines.

PHILIPPSON et LOEBE ( 87 ) étudiant l'incorporation de $^{32}P$ dans les lipides des zones corticale et médullaire du rein de rat dans des états de diurèse et d'antidiurèse provoqués, montrent des degrés de marquage différents dans les glycérylphosphoryléthanolamines et dans les glycérylphosphorylcholines Ces auteurs indiquent les relations entre cette incorporation et le turnover des phosphatidyléthanolamines et des phosphatidylcholines.

L'influence de la nourriture sur le métabolisme des lipides du rein a été surtout étudiée par BURNS et ELWOOD ( 32 ) sur des rats normaux ou diabétiques ; le rein de sujets diabétiques a une lipogénèse plus élevée que le rein normal quelque soit le régime auquel est soumis l'animal. L'incorporation de 1-$^{14}C$ acétate dans le cholestérol du rein de rat normal ou diabétique n'est pas modifiée par la nourriture, par contre, chez le diabétique, le rein contient des proportions élevées d'acide linoléique.

FEWSTER (24 ) analyse les acides gras des phospholipides de reins de rat soumis à des régimes riches ou déficients en choline ; il indique pour ces derniers, par rapport à des rats témoins, une augmentation des taux d'acides palmitique et oléique et une diminution des pourcentages d'acides stéarique, linoléique et arachidonique.

## 3 _ Sulfatides

Dans le tissu rénal, les sulfatides sont présents en faible quantité; soupçonnés par LANDSTEINER en 1925 ( 34 ) ils n'ont été isolés que récemment

par GREEN et ROBINSON ( 35 ) ; de ce fait, leur métabolisme est mal connu.

Nous pouvons citer les travaux de GREEN et ROBINSON ( 36 ) qui étudient l'incorporation de $^{35}S$ dans les sulfatides de différents organes (foie, cerveau, rein, rate) en fonction du temps. Le maximum d'incorporation dans le rein se situe 24 heures après l'injection intrapéritonéale, l'activité métabolique diminue ensuite assez rapidement puis plus lentement et reste mesurable jusqu'à 32 jours.

Le métabolisme pathologique des sulfatides est dominé par la leucodystrophie métachromatique de SCHOLTZ depuis que JATZKEWITZ ( 88 ) ( 89 ) a montré que le taux de ces derniers était cinq à six fois plus élevé que normalement dans la substance blanche cérébrale.

Dans la forme infantile de cette maladie, SVENNERHOLM ( 37 ) note, en plus de modifications lipidiques très nettes au niveau du cerveau, une augmentation du taux des sphingogalactolipides rénaux surtout des sulfatides (2,93 % du poids sec au lieu de 0,13 % dans le rein normal) ; anatomiquement, dans la maladie de SCHOLTZ, les sulfatides sont localisés au niveau du rein, dans les cellules épithéliales de l'anse de Henlé et la partie distale des tubes contournés.

MEHL et JATZKEWITZ ( 90 ) ont isolé et purifié de la fraction mitochondriale de rein de porc une cérébroside sulfatase qui scinde spécifiquement la molécule de sulfatide en cérébroside et sulfate ; l'activité enzymatique est plus forte dans le rein que dans le cerveau ; ces auteurs supposent l'absence de cette enzyme dans la leucodystrophie

L'activité de la sulfatase A est également étudiée chez le rat par AUSTIN ( 91 ) en fonction du développement de l'animal ; cette activité, beaucoup plus élevée dans le rein que dans le foie et le cerveau, est maximale entre les dix et quinze premiers jours de la vie.

DEUXIEME PARTIE

# Recherches Personnelles

# RECHERCHES PERSONNELLES

Nos recherches ont eu pour but :

1) D'analyser et d'évaluer les lipides du rein humain normal par des méthodes de chromatographie sur colonne et en couche mince et de déterminer la composition en acides gras des principaux lipides par chromatographie en phase gazeuse,

2) De comparer la composition lipidique des zones corticale et médullaire,

3) D'étudier l'incorporation de $^{32}P$ dans les phospholipides du rein de rat et leur turnover pour mieux comprendre le métabolisme rénal des lipides dans le but de connaître ultérieurement la place des lipides dans la pathologie de ce tissu.

Nous décrirons en premier lieu les techniques d'analyse et de dosage utilisées, puis exposerons nos résultats analytiques et métaboliques avant d'entreprendre de tirer les principales conclusions qu'ils apportent.

CHAPITRE I

# METHODES D'ANALYSE

## I - PRELEVEMENT ET DISSECTION

Pour éviter une altération des constituants biochimiques du rein et une dégradation enzymatique des lipides, les organes ont été prélevés* à l'autopsie sur des sujets ne présentant aucune affection rénale. Placés dans la glace, leur transport au laboratoire est effectué le plus rapidement possible et les organes sont aussitôt soumis à la dissection.

Après ouverture longitudinale du rein en deux lobes et plusieurs lavages par du sérum physiologique pour éliminer le sang, nous séparons soigneusement la zone corticale et la zone médullaire à laquelle nous joignons les papilles.

Les deux parties anatomiques sont pesées, broyées finement à l'ultraturax dans un petit volume d'éthanol puis soumises à l'extraction lipidique.

## II - EXTRACTION DES LIPIDES

Deux sortes de techniques d'extraction ont été utilisées :

a) Une extraction du broyat par un mélange d'alcool et d'éther en opérant comme suit :

trois volumes d'éthanol sont ajoutés au broyat et agités mécaniquement

* Les organes nous ont été fournis par le service d'anatomo-pathologie de l'Hôpital Purpan de Toulouse et nous remercions vivement les Professeurs BOUISSOU H. et FABRE J.

pendant une heure ; le mélange est filtré, la pulpe traitée successivement par des mélanges d'alcool et d'éther (3-1 puis 1-3 v/v) et enfin par de l'éther. Les solvants sont rassemblés et évaporés à sec sous vide, l'extrait est repris par du chloroforme, filtré, les lipides sont conservés en solution chloroformique à -20°C.

b) Une extraction de la pulpe de tissu par un mélange d'isopropanol et de chloroforme décrite par ROSE et OKLANDER ( 92 ) pour l'extraction des lipides des globules rouges.

Le tissu est agité mécaniquement avec dix volumes d'alcool isopropylique pendant une heure ; on ajoute sept volumes de chloroforme et on agite une heure à nouveau.

Le mélange est filtré et les solvants évaporés sous vide.

Le résidu est repris par du chloroforme et filtré.

## III_ PURIFICATION DES EXTRAITS

De préférence à la méthode de purification de FOLCH ( 93 ), les extraits lipidiques ont été purifiés en reprennant le résidu sec par deux volumes de chloroforme, un volume de méthanol et un volume d'eau.

Le mélange est violemment agité, les deux phases séparées par centrifugation et la phase supérieure rejetée.

La même opération est répétée trois fois.

La phase inférieure chloroformique est évaporée à sec. Ce résidu constituant les lipides totaux est pesé après dessication sous vide pendant 24 h.

Les lipides totaux sont remis en solution dans un mélange de chloroforme-méthanol (1-1) en un volume bien déterminé.

Cet extrait sert à effectuer :

- dosage du phosphore et mesure éventuelle de l'activité,
- dosage du cholestérol,
- chromatographie en couche mince.

Cette méthode nous a permis dans le cas de l'étude de l'incorporation du $^{32}P$ d'éliminer dans la phase aqueuse la plus grande partie du radiophosphore minéral.

# IV_METHODES D'ANALYSE PROPREMENT DITES

## A_Méthodes de fractionnement

### 1_chromatographie sur colonne

D'emploi très large aujourd'hui, le fractionnement sur colonne d'acide silicique permet la séparation de diverses classes de lipides grâce à l'utilisation combinée de solvants organiques polaires et apolaires.

Ce mode de fractionnement a été mis au point par BORGSTROM (94, 95) qui fractionne à partir d'un extrait lipidique total deux groupes :

- les lipides non phosphorés, élués par du chloroforme,
- les phospholipides élués par du méthanol.

Les premiers peuvent être fractionnés en glycérides, esters de cholestérol, acides gras libres et cholestérol libre grâce à des mélanges éluants d'éther de pétrole et d'éther selon une technique décrite par AYRAULT-JARRIER ( 96 ).

Les phospholipides sont fractionnés sur colonne d'acide silicique Mallinckrodt (100 mesh) activé par chauffage à 110° pendant 24 heures.

Nous mélangeons cette poudre avec de l'hyflo-supercel à raison de 2 parties pour 1 partie.

La quantité d'acide silicique doit être 50 fois supérieure au poids de phospholipides à fractionner.

Le mélange des poudres est lavé au chloroforme pour enlever les particules fines et placé dans des colonnes de 1 cm de diamètre et de 30 cm de hauteur.

Les phospholipides en solution chloroformique et mélangés à une petite quantité d'adsorbant sont versés sur la colonne et élués par du chloroforme progressivement enrichi en méthanol.

Nous avons utilisé à la suite de POLONOVSKI ( 97 ) la séquence des solvants suivants :

| | | |
|---|---|---|
| Chloroforme ..... | | 50 ml |
| Chloroforme-méthanol | (15 p.-1 p.) | 100 ml |
| " " | (12 p.-1 p.) | 100 ml |
| " " | ( 7 p.-1 p.) | 100 ml |
| " " | ( 4 p.-1 p.) | 100 ml |
| " " | ( 3 p.-2 p.) | 150 ml |
| " " | ( 5 p.-4 p.) | 100 ml |
| " " | ( 1 p.-1 p.) | 100 ml |
| Méthanol ..... | | 100 ml |

Les diverses fractions obtenues sont évaporées sous vide, reprises par une quantité déterminée de solvants et utilisées pour le dosage du phosphore et les chromatographies en couche mince.

## 2. chromatographie sur couche mince

L'adsorbant utilisé le plus fréquemment est le silica gel pour chromatographie en couche mince selon STAHL ( 98 ).

Les couches minces sont préparées en étalant sur des plaques de verre de 20 x 20 cm grâce à un appareil de type Camag un mélange de 60 grammes de silica gel G Merck et de 120 grammes d'eau, parfaitement homogénéisé.

Les plaques, ayant de 250 à 400 $\mu$ d'épaisseur sont desséchées quelques minutes à l'étuve à 110° et activées quinze minutes au moment de l'emploi selon les indications de SKIPSKI et coll. ( 99 ).

Plusieurs sortes de chromatographies ont été réalisées pour la séparation des diverses fractions lipidiques.

a) PHOSPHOLIPIDES

Trois groupes de solvants ont été utilisés pour des séparations monodimensionnelles :

- un solvant neutre décrit par WAGNER (100, 101) et repris par de nombreux auteurs (102, 103, 104, 105) se compose de :

Chloroforme ..... 65

Méthanol ..... 25
Eau ..... 4, v/v.

- un solvant acide préconisé par LEGRAND ( 106 ) est constitué de :

Chloroforme ..... 60
Méthanol ..... 30
Acide acétique .... 6
Eau ..... 1, v/v.

- un solvant alcalin utilisé par SINGH et PRIVETT ( 107 ) :

Chloroforme ..... 65
Méthanol ..... 35
Ammoniaque pure ... 5, v/v.

Nous avons utilisé pour des séparations en double dimension le solvant alcalin en premier lieu, séchage de la plaque, puis le solvant neutre.

Dans tous ces types de chromatographie une meilleure saturation des cuves est obtenue en tapissant l'intérieur d'une feuille de papier.

b) LIPIDES NEUTRES

Les lipides de l'éluat chloroformique sur colonne d'acide silicique sont séparés dans le mélange suivant selon LEGRAND ( 106 ) :

Ether de pétrole ... 80
Ether sulfurique ... 20
Acide acétique ..... 1, v/v.

A la suite de NIEMINEN ( 108 ) nous avons utilisé un deuxième type de séparation comprennant une migration dans un mélange n Hexane-Benzène (5-95 v/v) sur 8 cm puis n Hexane sur 10 cm.

Nous avons séparé les esters du cholestérol en utilisant d'abord le mélange n Hexane-Benzène puis le tétrachlorure de carbone sur 9 cm.

Enfin les esters méthyliques d'acides gras ont été purifiés avant leur analyse en phase gazeuse par chromatographie sur couche mince dans le benzène ou le toluène et séparés ainsi des diméthylacétals, selon HOEVET et coll. ( 109 ), VISWANATHAN et coll. (110, 111).

## 3.réactifs d'identification

En général nous avons révélé les lipides par exposition aux vapeurs d'iode.

Dans certains cas nous les avons identifiés après pulvérisation d'une solution à 2 p. 100 dans l'éthanol d'acide phosphomolybdique et chauffage de la plaque quelques minutes à 110°C, les lipides apparaissent alors en taches bleu-vert sur fond jaune.

Des réactifs particuliers ont été utilisés :

- POUR LES PHOSPHOLIPIDES :pulvérisation du réactif de ZINZADZE ( 112 )

| | | |
|---|---|---|
| Sol. I | $H_2SO_4$ 25 N ..... | 1 000 ml |
| | $M_o O_3$ ..... | 40,11 g |
| Sol. II | poudre de molybdène ..... | 1,78 g |
| | solution I ..... | 500 ml |

Le mélange est amené à ébullition pendant 15' puis décanté pour éliminer le résidu.

On mélange à volume égal les solutions I et II et on ajoute 2 vol. d'eau.

La solution finale est jaune verdâtre.

Les lipides phosphorés apparaissent en bleu à la température du laboratoire.

- POUR LES LIPIDES CHOLINIQUES : réactif de DRAGGENDORFF, selon SCHLEMMER ( 113 ).

On mélange extemporairement les deux solutions.

| | | |
|---|---|---|
| Sol. I | $Bi(NO_3)_3$, 5 $H_2O$ ..... | 1,7 g |
| | $CH_3COOH$ 20 % ..... | 100 ml |
| Sol. II | K I | 40 g |
| | eau distillée | 100 ml |

Au moment de l'emploi, nous opérons la dilution :

| | |
|---|---|
| Solution I | 4 ml |
| Solution II | 1 ml |
| Eau distillée | 20 ml |

Les lipides choliniques apparaissent sous la forme de taches orangées sur fond jaune.

- POUR LES LIPIDES AMINES : solution de ninhydrine à 0,2 p. 100 dans l'acétone et passage quelques minutes à 100° : taches roses.

- L'étude des acides gras des divers lipides a été réalisée après révélation sur les chromatogrammes par pulvérisation d'une solution dans l'éthanol à 80° de 2-7 dichlorofluoresceine et examen en lumière ultraviolette.

## 4_chromatographie en phase gazeuse

L'obtention des acides gras a été réalisée de la façon suivante :

1) Les acides gras libres, sont séparés par chromatographie en couche mince, localisés sur le chromatogramme en lumière ultraviolette après pulvérisation d'une solution de 2-7 dichlorofluoresceine, ils sont élués dans une petite colonne par du chloroforme puis de l'éther ; ils sont ensuite méthylés par le diazométhane en solution éthérée.

2) Triglycérides et stérides isolés par chromatographie en couche mince, localisés et élués comme les acides gras libres, sont saponifiés par de la potasse N au bain-marie à 70° pendant deux heures. Les acides gras libérés sont extraits à trois reprises par de l'éther de pétrole, purifiés par trois lavages à l'eau puis méthylés par le diazométhane.

3) Les divers phospholipides sont isolés par chromatographie en couche mince soit monodimensionnelle (solvant neutre), soit bidimensionnelle.

Après pulvérisation de 2-7 dichlorofluoresceine les phospholipides sont repérés en lumière ultraviolette, cerclés, le silica gel est récupéré, placé dans une petite colonne pour l'élution par les mélanges :

Chloroforme-méthanol (2-1 puis 1-2 v/v),

Chloroforme-méthanol-eau (1-2-1 v/v).

Les constituants isolés sont traités par du méthanol sulfurique à 5 p. 100 dans un petit appareil à reflux au bain-marie à 70° pendant deux heures.

Les acides gras transméthylés sont extraits à trois reprises par de l'éther de pétrole ensuite lavé à l'eau.

Les divers esters méthyliques sont dissous dans de l'hexane et chromatographiés en phase gazeuse dans un appareil Aerograph, type 204 B sur colonne de diéthylène-glycol succinate à la température de 180°C, débit d'azote : 40 ml/min.

Après étalonnage grâce à des mélanges témoins d'esters méthyliques d'acides gras, les divers constituants sont évalués en pourcentage molaire après planimétrie des chromatogrammes.

## B_ Méthodes de dosage chimique

### 1_dosage du phosphore

Nous l'avons effectué après minéralisation, sur l'extrait total ou sur les phospholipides isolés.

De préférence à la minéralisation par l'acide sulfurique et l'eau oxygénée à 110 vol., préconisée par DELSAL ( 114 ) FISKE et SUBBAROW ( 115 ) ALLEN ( 116 ), nous utilisons la minéralisation perchlorique selon CHEN ( 117 ) suivie de coloration par le réactif suivant :

Acide ascorbique à 10 % .... 1 vol.
Molybdate d'$NH_4$ à 2,5 % ....1 vol.
$H_2SO_4$ 6 N ..... 1 vol.
Eau distillée ..... 1 vol.

Ce mélange est préparé aussitôt avant l'emploi ; le molybdate permet la coloration et l'acide ascorbique joue le rôle de réducteur du complexe.

Lorsque nous dosons le phosphore d'un extrait lipidique total en solution dans un mélange chloroforme-méthanol, nous évaporons à sec dans 1 tube à essai une quantité aliquote avant de mettre 0,5 ml d'acide perchlorique.

S'il s'agit de phospholipides séparés par chromatographie en couche mince, ceux-ci sont révélés à l'iode et nous recueillons dans les tubes la poudre correspondante, à l'aide d'une spatule. Nous versons 0,5 ml d'acide perchlorique sur la poudre.

Les tubes sont placés à 180° dans un bain de sable pendant deux heures. Ensuite dans les tubes refroidis nous ajustons le volume à 4 ml avec de l'eau distillée et ajoutons 4 ml du réactif de dosage, nous les plaçons dans un bain-marie à 37° pendant une heure et demie, temps nécessaire pour que la coloration bleue se développe au maximum.

Quand le dosage est effectué à partir de fractions recueillies sur couche mince, nous centrifugeons les tubes avant d'effectuer les lectures.

Nous effectuons les lectures à 820 mμ sur un spectrophotomètre type Jobin et Yvon, contre une gamme d'une solution de $PO_4HNa_2$ à 5 γ/ml.

Le dosage est sensible de 0,1 γ à 10 γ de phosphore. De nombreux auteurs dont SCHMIDT ( 118 ), SCHMIDT, BENOTTI et TANHAUSER ( 119 ) conseillent de multiplier le taux de phosphore par 25 pour obtenir le taux de phospholipides.

### 2-dosage du cholestérol

Nous avons dosé le cholestérol par la méthode de LIEBERMAN-BURCHARD ( 120 ) utilisant un mélange d'anhydride acétique et d'acide sulfurique en effectuant un étalonnage à l'aide d'une solution témoin de cholestérol libre ou de palmitate de cholestérol.

Ces dosages ont été effectués sur les taches récupérées sur les chromatogrammes en couche mince.

Nous avons effectué les lectures à 620 mμ sur un spectrophotomètre type Jobin et Yvon.

## C-Etude isotopique

### 1-technique d'incorporation de $^{32}P$

Une série de rats Whistar (250 g) reçoit le même jour une injection intrapéritonéale de 500 μCi d'une solution de $^{32}PO_4HNa_2$.

Les rats sont sacrifiés à intervalles de temps déterminés, les reins sont prélevés, aussitôt lavés dans du sérum physiologique pour enlever le sang, séchés sur papier filtre et pesés.

L'extraction lipidique est effectuée selon la technique déjà exposée de ROSE et OKLANDER ( 92 ).

Après purification, les lipides sont repris par du mélange chloroforme -méthanol à volumes égaux.

## 2_technique de comptage

Sur une partie de l'extrait, nous dosons le phosphore et déterminons l'activité dans un compteur à scintillation Packard Tricarb 3320 en utilisant 10 ml par flacon de mesure d'un liquide constitué de un volume d'eau pour 5 volumes de dioxane contenant 10 p. 100 de naphtalène, 0,3 p. 100 de diméthyl-1-4-bis-2(4-méthyl-5-phényloxazolyl) benzène et 0,7 p. 100 de diphényloxazole.

Sur une autre partie, nous effectuons la séparation des différents phospholipides par chromatographie sur couche mince de l'extrait total.

Les plaques sont mises au contact de films Kodirex pendant des temps variables selon l'activité

Les films sont développés.

Nous repérons les phospholipides par exposition des plaques dans des vapeurs d'iode. Les différentes taches sont grattées et récupérées dans les flacons de mesure de comptage dans lesquels nous ajoutons 10 ml du mélange scintillant.

CHAPITRE II

# RESULTATS

## I - ETUDE ANALYTIQUE

### A - Fractionnement des lipides

#### *1 - sur colonne d'acide silicique*

L'extrait lipidique total, chromatographié sur colonne d'acide silicique est divisé en deux fractions, l'une éluée par le chloroforme : acides gras libres, glycérides, cholestérol libre et stérides, l'autre éluée par le méthanol : phospholipides

Les phospholipides sont séparés sur une nouvelle colonne d'acide silicique par un gradient discontinu de méthanol dans du chloroforme.

L'étude des chromatogrammes (fig. 1 et 2) permet d'identifier différentes fractions :

- 1'éluat 12/1 entraîne essentiellement des cardiolipides (C) accompagnés d'un résidu d'acides gras libres,

- avec 1'éluat 7/1, deux taches apparaissent, l'une importante correspondant à la majorité des phosphatidyléthanolamines (PE) et l'autre beaucoup plus faible qui est un reste de cardiolipides ; entre ces deux taches nous notons la présence probable d'acides phosphatidiques,

- le solvant 4/1 permet d'épuiser les phosphatidyléthanolamines et élue les phosphatidylsérines et phosphatidylcholines mal séparées 1'une de 1'autre et que nous retrouvons dans la fraction 3/2,

- les éluats 5/4 et 1/1 entraînent les sphingomyélines (SPH) et une faible quantité de lysophosphatidylcholines (LPC),

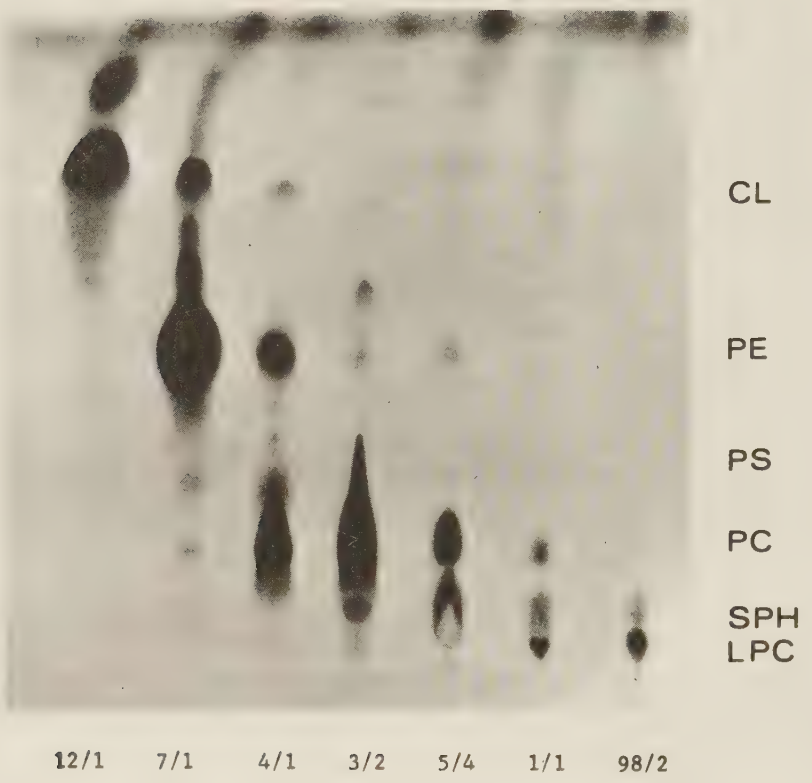


FIG. I - Chromatographie sur couche mince de silicagel G Merck (épaisseur : 400 $\mu$) des phospholipides du rein humain normal.
(Zone corticale) après fractionnement sur colonne d'acide silicique.
Solvant : chloroforme-méthanol-acide acétique-eau (60-30-6-1, v/v).
Révélation : solution d'acide phosphomolybdique à 2 p. 100 dans l'éthanol.

CL : cardiolipides.
PE : phosphatidyléthanolamines.
PS : phosphatidylsérines.
PC : phosphatidylcholines.
SPH : sphingomyélines.
LPC : lysophosphatidylcholines.

FIG. 2 - Chromatographie sur couche mince de silicagel G Merck (épaisseur : 400 $\mu$) des phospholipides de la zone médullaire du rein humain normal après fractionnement sur colonne d'acide silicique.
Solvant : chloroforme-méthanol-acide acétique-eau (60-30-6-1, v/v),
Révélation : acide phosphomolybdique en solution à 2 % dans l'éthanol.

CL : cardiolipides,
PE : phosphatidyléthanolamines.
PS : phosphatidylsérines.
PC : phosphatidylcholines.
SPH : sphingomyélines.
LPC : lysophosphatidylcholines.

- avec le système 98/2, nous individualisons les lysophosphatidylcholines et deux taches de sphingomyélines.

Les imperfections de la chromatographie sur colonne nous ont incitée à faire appel à la chromatographie bidimensionnelle de façon à obtenir de meilleures séparations.

## 2_par chromatographie en couche mince

a) LIPIDES NEUTRES

Les lipides, élués par le chloroforme sur colonne d'acide silicique, sont analysés par chromatographie sur couche mince (fig 3). Elle permet de séparer dans l'ordre des Rf croissants :

Monoglycérides (MG)
Cholestérol libre (CL)
Diglycérides (DG)
Acides gras libres (AGL)
Triglycérides (TG)
Cholestérol estérifié (CE).

L'étude comparative de ces lipides dans les zones corticale et médullaire révèle une teneur en acides gras libres nettement plus élevée dans le cortex ; par contre les triglycérides et les stérides y sont moins abondants que dans la zone médullaire.

Une tache non identifiée (X) située au-dessus des acides gras libres tant dans l'extrait total que dans l'extrait cortical, pourrait correspondre aux esters méthyliques d'acides gras signalés par NIEMINEN ( 108 ) et LEIKOLA ( 121 ).

L'emploi d'un autre système de solvants nous a permis de reconnaître plusieurs fractions dans les stérides. La chromatographie sur couche mince dans le tétrachlorure de carbone sépare quatre fractions principales (fig. 4) tandis que la migration dans un mélange hexane-benzène puis dans le tétrachlorure de carbone fait apparaître deux taches supplémentaires de plus faible importance (fig. 5). La quantité de stérides de la médulla est beaucoup plus élevée que celle du cortex ; ces quatre fractions correspondent d'après NIEMINEN ( 108 ) à des stérides contenant des :

acides gras saturés (1)
acides gras monoéthyléniques (2)

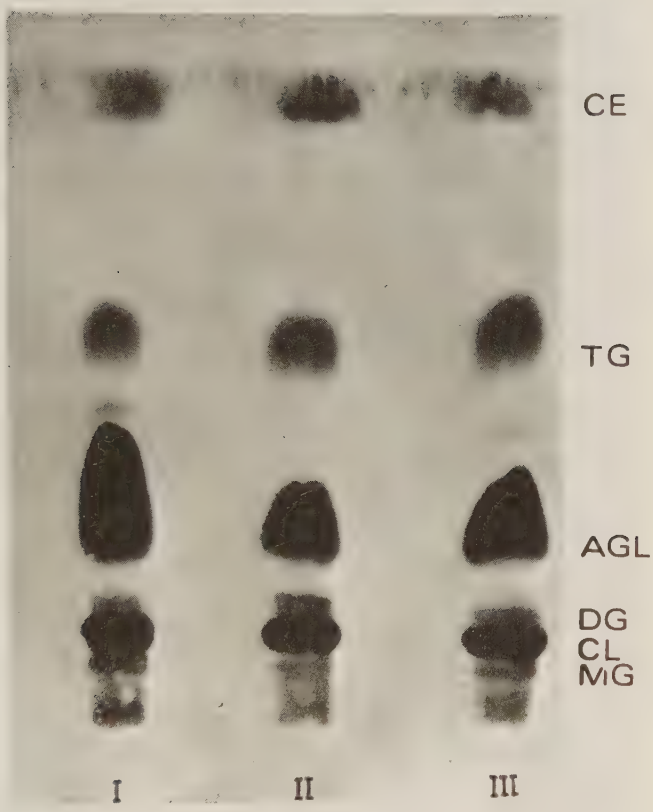


FIG. 3 - Chromatographie sur couche mince de silicagel G Merck, des lipides élués par le chloroforme du rein humain normal. Zone corticale (I), zone médullaire (II), organe entier (III). Dépôt : 100 µg de lipides.

Solvant : éther de pétrole-éther-acide acétique (80-20-1, v/v)

Révélation : solution d'acide phosphomolybdique à 2 p. 100 dans l'éthanol.

CE = cholestérol estérifié
TG = triglycérides
AGL = acides gras libres
DG = diglycérides
CL = cholestérol libre
MG = monoglycérides.

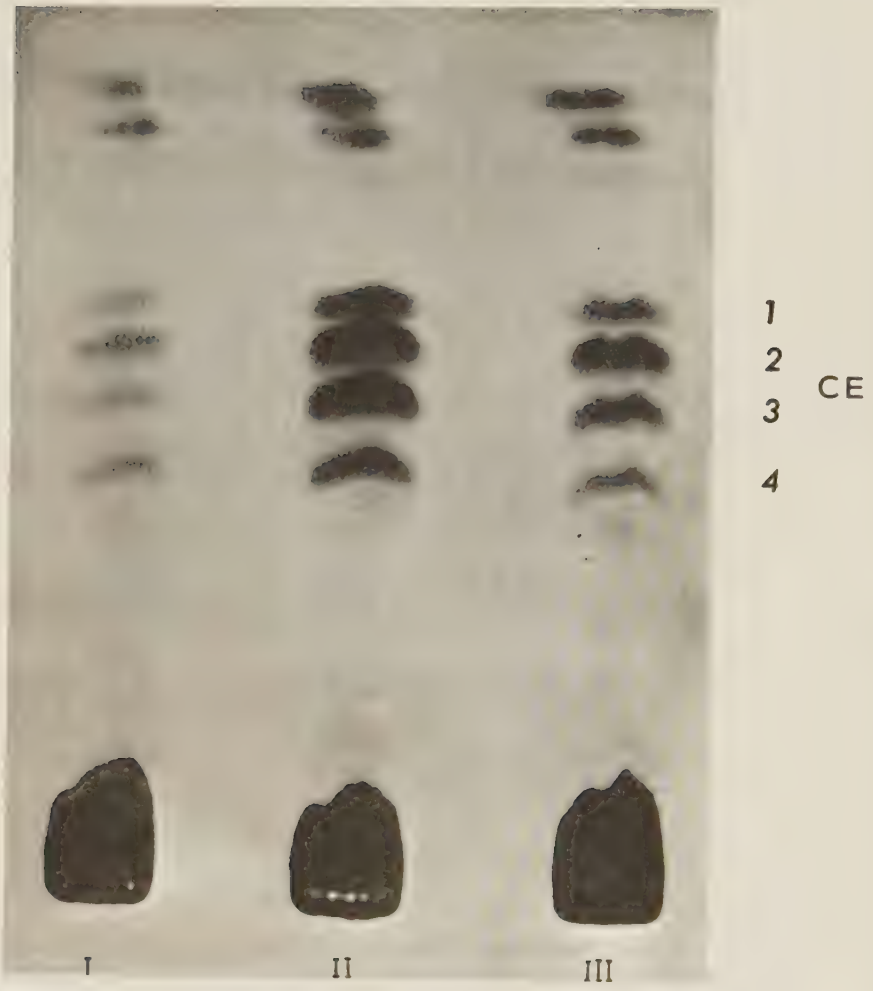


FIG. 4 - Chromatographie sur couche mince de gel de silice $F_{254}$ Merck des lipides élués par le chloroforme du rein humain normal : Zone corticale (I), zone médullaire ( II ), organe entier ( III ). Solvant : tétrachlorure de carbone sur 10 cm (trois migrations). Révélation : solution d'acide phosphomolybdique à 2 p. 100 dans l'éthanol.

CE = cholestérol estérifié.

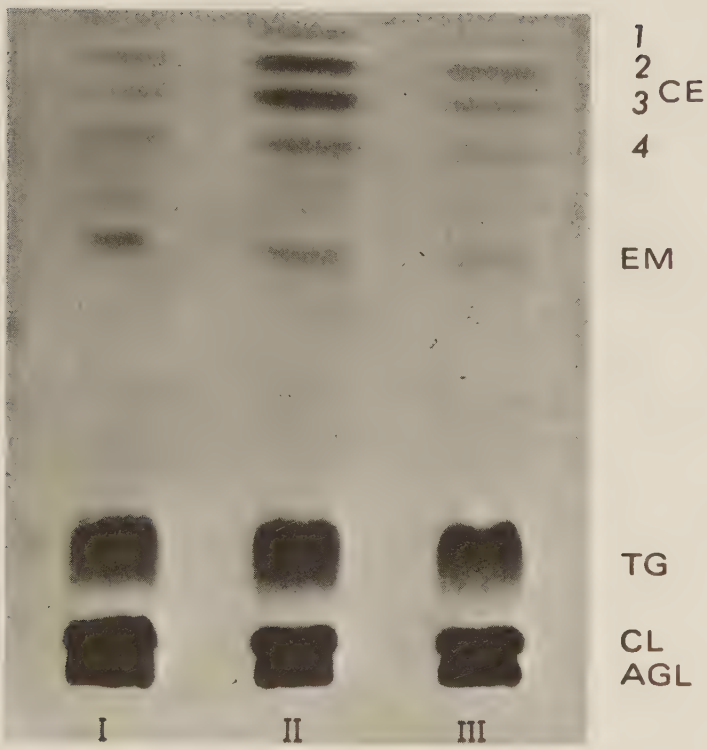


FIG. 5 - Chromatographie sur couche mince de silicagel $F_{254}$ Merck des lipides élués par le chloroforme du rein humain normal : Zone corticale (I), zone médullaire (II), organe entier (III).
Solvants : n Hexane-benzène (5,95 v/v) sur 8 cm puis après séchage de la plaque : tétrachlorure de carbone sur 16 cm.
Révélation : solution d'acide phosphomolybdique à 2 p. 100 dans l'éthanol.

CE = cholestérol estérifié
EM = esters méthyliques d'acides gras
TG = triglycérides
CL = cholestérol libre
AGL= acides gras libres.

acides gras diéthyléniques (3)
acides gras polyéthyléniques (4).

b) PHOSPHOLIPIDES

Monodimensionnelle

Elle permet de séparer, par ordre de Rf croissant :

- en solvant neutre : lysophosphatidylcholines, sphingomyélines, phosphatidylcholines et phosphatidylsérines, cardiolipides, phosphatidyléthanolamines (fig. 1 et 2),

- en solvant acide : lysophosphatidylcholines, sphingomyélines, phosphatidylcholines et phosphatidylsérines, phosphatidyléthanolamines,cardiolipides (fig. 6),

- en solvant alcalin : lysophosphatidylcholines, sphingomyélines et phosphatidylsérines, phosphatidylcholines, phosphatidyléthanolamines, cardiolipides (fig 7).

Etant donné les différences de migration des divers phospholipides nous avons utilisé divers systèmes de solvants.

La nature du solvant modifie considérablement le comportement chromatographique des phosphatidylsérines et des cardiolipides. Leur chevauchement avec d'autres phospholipides nous ont incitée à utiliser une méthode de séparation par chromatographie en double dimension.

Bidimensionnelle

La chromatographie sur couche mince en monodimension ne suffit pas toujours pour séparer des phospholipides à Rf voisins. Nous avons pallié à cet inconvénient en effectuant des chromatographies bidimensionnelles utilisant les deux solvants précédents.

Le chromatogramme (fig. 8) des fractions 12/1, 7/1 et 4/1 montre, par rapport à la chromatographie (fig. 1) des mêmes fractions une meilleure séparation des phosphatidyléthanolamines et phosphatidylsérines.

Cette méthode, appliquée au fractionnement des phospholipides marqués, nous a permis de mieux les isoler pour mesurer leur activité spécifique.

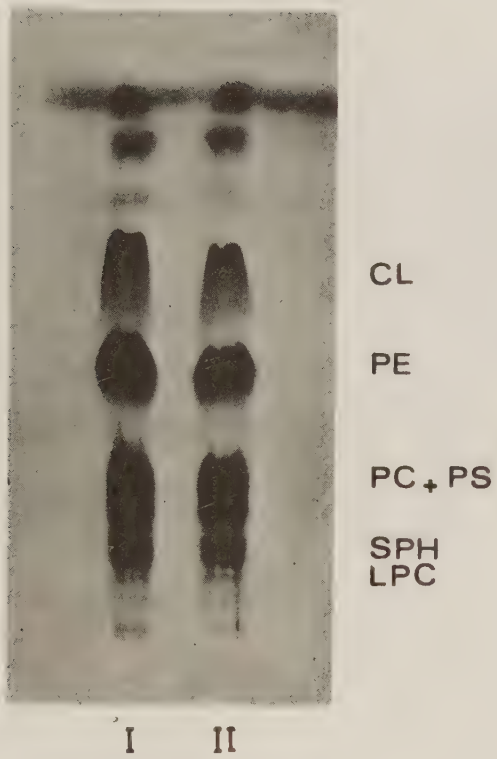


FIG. 6 - Chromatographie sur couche mince de gel de silice $F_{254}$ Merck des phospholipides du rein humain normal : Zone corticale (I), zone médullaire (II).

Solvant : chloroforme-méthanol-acide acétique-eau (60-30-6-1, v/v).

Révélation par vapeurs d'iode.

LPC : lysophosphatidylcholines.
CL : cardiolipides.
SPH : sphingomyélines.
PS : phosphatidylsérines.
PE : phosphatidyléthanolamines.
PC : phosphatidylcholines.

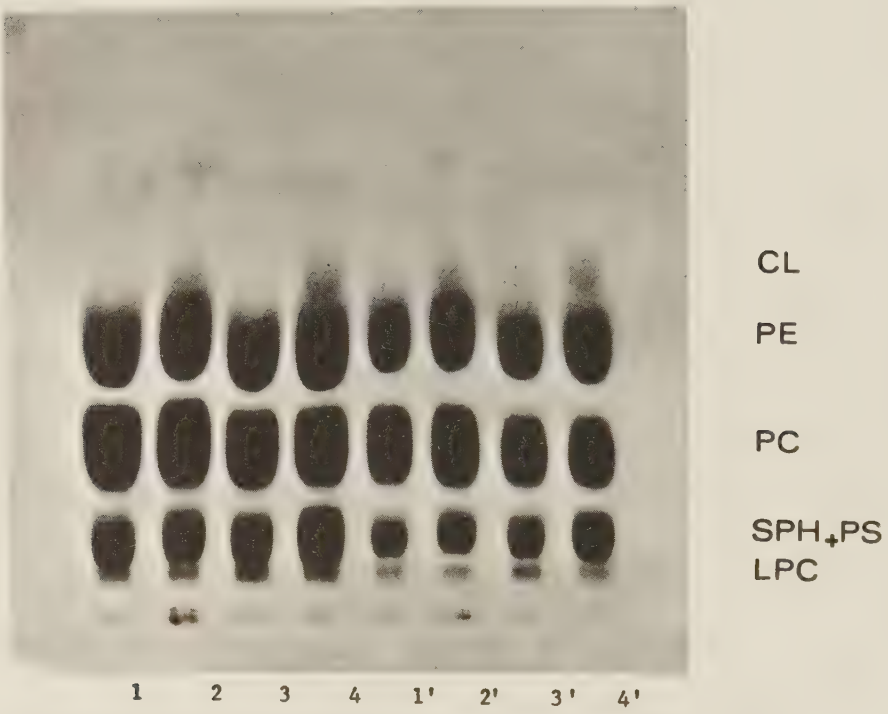


FIG. 7 - Chromatographie sur couche mince silicagel C Merck (épaisseur 250 mμ) des phospholipides de rein de rat.
Quantité de P déposée en μg : 1-2-3-4 : 22 μg
1'-2'-3'-4' : 11 μg.
Solvant alcalin : chloroforme-méthanol-ammoniaque (65-35-5, v/v).
Révélation par solution alcoolique d'acide phosphomolybdique à 2 %.

CL : cardiolipides
PE : phosphatidyléthanolamines
PC : phosphatidylcholines
SPH : sphingomyélines
PS : phosphatidylsérines
LPC : lysophosphatidylcholines.

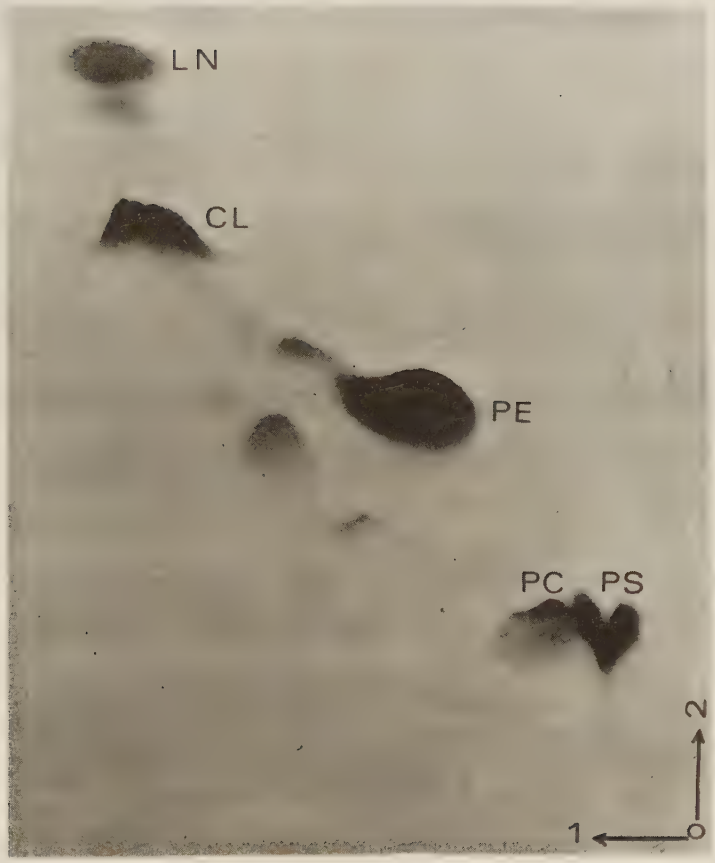


FIG. 8 - Chromatographie bidimensionnelle en couche mince sur silicagel G Merck des phospholipides de rein humain normal fractionnés sur colonne d'acide silicique (fractions 12/1, 7/1, 4/1).
1° dimension : chloroforme-méthanol-acide acétique-eau (60-30-6-1, v/v).
2° dimension : chloroforme-méthanol-ammoniaque 3,5 N (65-35-4, v/v).

CL : cardiolipides.
PE : phosphatidyléthanolamines.
PC : phosphatidylcholines.
PS : phosphatidylsérines.
LN : lipides neutres.

## B - Dosages chimiques

Les valeurs des lipides totaux, des phospholipides et des lipides neutres rapportées dans le tableau 11, montrent des taux plus élevés dans le cortex que dans la médulla.

| | Lipides totaux | Phospholipides | Lipides non Phosphorés |
|---|---|---|---|
| Cortex | 3,20 | 1,80 | 0,90 |
| Médulla | 2,70 | 1,28 | 0,75 |

TABLEAU 11

Teneur lipidique du rein humain exprimée en grammes pour 100 g. de tissu frais.

### 1 - cholestérol

Nous avons séparé le cholestérol libre du cholestérol estérifié par chromatographie en couche mince (fig. 3). Les taches éluées ont été dosées par la méthode de LIEBERMANN ( 120 ).

| | Rein total | Zone corticale | Zone médullaire |
|---|---|---|---|
| Cholestérol libre | 220 | 240 | 160 |
| Cholestérol estérifié | 25 | 20 | 25 |

TABLEAU 12

Composition en cholestérol libre et estérifié du rein humain (mg pour 100 g. de tissu frais).

Le cholestérol total (dont 90 % est sous forme libre) représente 8 % des lipides totaux et 25 % des lipides neutres de l'organe entier.

## 2-phospholipides

Nous avons évalué les divers phospholipides après élution des taches chromatographiques en double dimension par le dosage du phosphore selon CHEN ( 117 ).

Leurs valeurs pour le rein humain sont rapportées dans le tableau 13.

| | Cortex | Médulla |
|---|---|---|
| Lysophosphatidylcholines | 5 | 5,5 |
| Sphingomyélines | 14,5 | 13 |
| Phosphatidylsérines | 7,5 | 8,5 |
| Phosphatidylcholines | 43 | 46,5 |
| Phosphatidyléthanolamines | 25 | 20,7 |
| Cardiolipides | 5 | 5,8 |

TABLEAU 13

Pourcentage des phospholipides du rein humain.

Deux faits essentiels sont à noter :

- le taux relativement élevé des lysophosphatidylcholines.
- une richesse notable en cardiolipides aussi bien dans la zone corticale que dans la zone médullaire.

D'autre part, le cortex moins riche en phosphatidylcholines que la médulla, contient davantage de phosphatidyléthanolamines.

Le tableau 14 indique les valeurs et pourcentages des lipides du tissu rénal de rat.

En comparant la composition lipidique des reins humain et de rat, nous constatons que les lipides totaux et les phospholipides totaux sont équivalents dans ces deux organes ; les phosphatidylcholines sont les constituants les plus abondants.

Les différences sont à noter au niveau des divers phospholipides

- lysophosphatidylcholines environ cinq fois plus élevées dans le tissu humain,
- sphingomyélines et cardiolipides plus abondants chez le rat.

| | |
|---|---|
| Lipides totaux (a) | 3,40 ± 0,40 |
| Phospholipides (a) | 1,84 ± 0,12 |
| Lysophosphatidylcholines (b) | 1,3 ± 0,2 |
| Sphingomyélines | 17,5 ± 2,5 |
| Phosphatidylsérines | 9,2 ± 0,8 |
| Phosphatidylcholines | 37,3 ± 4,4 |
| Phosphatidyléthanolamines | 27,1 ± 3,0 |
| Cardiolipides | 7,6 ± 0,2 |

TABLEAU 14

(a) en grammes pour 100 g de poids frais.
(b) pourcentage de phospholipides du rein de rat.

## C.Composition en acides gras

### *1.acides gras libres*

Les acides gras libres isolés de l'éluat chloroformique par chromatographie en couche mince sont séparés en phase gazeuse sous forme d'esters méthyliques. La longueur de la chaîne n'excède pas vingt atomes de carbone (tableau 15).

Nous remarquons essentiellement un pourcentage plus élevé d'acides insaturés dans la zone médullaire où prédominent les acides oléique (36 p.100) et arachidonique (17,2 p. 100).

| Acides | Rein total | Zone corticale | Zone médullaire |
|---|---|---|---|
| 14 : 0 | 0,8 | traces | 0,8 |
| 16 : 0 | 30,2 | 26,5 | 23 |
| 16 : 1 | 1,5 | 1,5 | 1,5 |
| 18 : 0 | 13 | 15,3 | 10 |
| 18 : 1 | 35,2 | 29 | 36 |
| 18 : 2 | 12 | 14 | 9 |
| 20 : 0 | traces | traces | traces |
| 20 : 1 | traces | traces | 2,5 |
| 20 : 3 | traces | traces | traces |
| 20 : 4 | 7,3 | 13,7 | |
| Saturés | 44 | 41,8 | 33,8 |
| Insaturés | 56 | 58,2 | 66,2 |

TABLEAU 15

Pourcentages des acides gras libres du rein humain des zones corticale et médullaire.

## 2_triglycérides

Leurs acides gras dans les zones médullaire et corticale sont très voisins avec une prédominance de l'acide palmitique pour les acides saturés. (24 et 18 p. 100) et de l'acide oléique pour les insaturés (47 et 36,8 p. 100).

Nous devons souligner que l'acide arachidonique est plus abondant dans la zone médullaire (10,4 p. 100) (tableau 16).

| Acides | Zone corticale | Zone médullaire |
|---|---|---|
| 14 : 0 | 1 | 1 |
| 15 : 0 | 2 | 6,2 |
| 16 : 0 | 24 | 18 |
| 16 : 1 | 3 | 3,6 |
| 18 : 0 | 5 | 6 |
| 18 : 1 | 47 | 36,8 |
| 18 : 2 | 8 | 6 |
| 20 : 0 | 3 | 9,2 |
| 20 : 1 | traces | traces |
| 20 : 2 | 2,8 | traces |
| 20 : 3 | 1,2 | 2,8 |
| 20 : 4 | 3 | 10,4 |
| 22 : 5 | traces | |
| Saturés | 35 | 40,4 |
| Insaturés | 65 | 59,6 |

TABLEAU 16

Pourcentages des acides gras des triglycérides des zones corticale et médullaire du rein humain.

## 3_phospholipides

a) PHOSPHOLIPIDES TOTAUX

Les esters méthyliques d'acides gras, purifiés par chromatographie sur couche mince dans le benzène et repris par l'hexane sont séparés en phase gazeuse.

Les phospholipides totaux (tableau 17) ont des proportions d'acides gras saturés et insaturés très voisines.

| Acides | Zone corticale | Zone médullaire |
|---|---|---|
| 14 : 0 | 1 | 1,3 |
| 16 : 0 | 26 | 32 |
| 16 : 1 | traces | traces |
| 18 : 0 | 20,3 | 12,6 |
| 18 : 1 | 23,3 | 28,2 |
| 18 : 2 | 7 | 7 |
| 18 : 3 | traces | 1,4 |
| 20 : 0 | traces | traces |
| 20 : 1 | traces | traces |
| 20 : 2 | 4 | 2 |
| 20 : 3 | traces | traces |
| 20 : 4 | 15 | 13,4 |
| 20 : 5 ou 20 : 6 | 2 | 0 |
| 22 : 0 | traces | traces |
| 23 : 0 | traces | traces |
| 24 : 0 | 0,4 | 0,9 |
| 24 : 1 | 1 | 1,2 |
| 25 : 0 | traces | traces |
| 26 : 0 | traces | traces |
| Saturés | 47,7 | 46,8 |
| Insaturés | 52,3 | 53,2 |

TABLEAU 17

Pourcentages des acides gras des phospholipides des zones corticale et médullaire du rein humain.

Nous y retrouvons les mêmes acides dont les principaux sont : palmitique, stéarique, oléique et arachidonique.

Une différence quantitative est à noter pour les acides en $C_{18}$, saturés et monoinsaturés : leur rapport, égal à l'unité dans le cortex s'élève au-dessus de 2 dans la médulla.

b) GLYCEROPHOSPHOLIPIDES

Nous distinguons dans ce groupe (tableaux 18 et 19).

- phosphatidyléthanolamines et phosphatidylcholines contenant autant d'acides saturés que d'acides insaturés,

- phosphatidylsérines et lysophosphatidylcholines où prédominent les acides saturés (70,5 et 76,1 p. 100 respectivement).

Aucun glycérophospholipide ne renferme d'acides gras à plus de vingt atomes de carbone.

A l'exception du taux de l'acide stéarique trois fois plus élevé dans les lécithines du cortex que dans celles de la zone médullaire, les différences de composition en acides gras des divers glycérophospholipides sont minimes.

L'acide arachidonique se rencontre essentiellement dans les phosphatidyléthanolamines et les phosphatidylsérines.

- une comparaison s'impose sur les proportions des acides stéarique et oléique dans les trois phospholipides majeurs (PE, PS, PC) :

taux élevé d'acide stéarique dans les phosphatidylsérines,

taux élevé d'acide oléique dans les phosphatidylcholines,

taux équivalent de ces deux acides dans les phosphatidyléthanolamines.

Dans les lysophosphatidylcholines rénales le pourcentage des acides saturés est trois à quatre fois plus élevé que celui des acides insaturés, avec une prédominance très nette de l'acide palmitique.

c) SPHINGOMYELINES

Contrairement aux autres phospholipides, des acides gras à chaîne supérieure à vingt atomes de carbone sont présents dans les fractions sphingomyéliniques (tableau 20).

Dans toutes les fractions le pourcentage des acides gras saturés est plus élevé que celui des acides gras insaturés : le rapport entre les acides gras saturés et insaturés est de 1,5 dans le groupe I et de 10 dans le groupe II

| Acides | PL totaux | PE | PS | PC | LPC |
|---|---|---|---|---|---|
| 14 : 0 | 1 | traces | 0,4 | 0,2 | 0,9 |
| 16 : 0 | 26 | 22,9 | 22,6 | 37 | 69,3 |
| 16 : 1 | traces | traces | 1,5 | 1 | 1 |
| 18 : 0 | 20,3 | 26,4 | 47,1 | 16,2 | 10,4 |
| 18 : 1 | 23,3 | 24,4 | 15,7 | 33,2 | 13,6 |
| 18 : 2 | 7 | 6,3 | 1,7 | 9,4 | 4,8 |
| 18 : 3 | traces | - | - | - | - |
| 20 : 0 | traces | traces | traces | traces | traces |
| 20 : 1 | traces | traces | traces | traces | - |
| 20 : 2 | 4 | traces | 2,0 | - | - |
| 20 : 3 | traces | traces | traces | traces | - |
| 20 : 4 | 15 | 19 | 9 | 3 | traces |
| 20 : 5 ou 6 | 2 | - | - | - | - |
| 22 : 0 | traces | - | - | - | - |
| 23 : 0 | traces | - | - | - | - |
| 24 : 0 | 0,4 | - | - | - | - |
| 24 : 1 | 1 | - | - | - | - |
| 25 : 0 | traces | - | - | - | - |
| 26 : 0 | traces | - | - | - | - |
| Saturés | 47,7 | 49,3 | 70,1 | 53,4 | 80,6 |
| Insaturés | 52,3 | 49,7 | 29,9 | 46,6 | 19,4 |

TABLEAU 18

Pourcentages des acides gras des phospholipides totaux et des principaux phospholipides du cortex rénal humain.

| Acides | PL totaux | PE | PS | PC | LPC |
|---|---|---|---|---|---|
| 14 : 0 | 1,3 | traces | 0,5 | 0,4 | 0,6 |
| 16 : 0 | 32 | 21 | 22 | 46 | 59 |
| 16 : 1 | traces | traces | 1,2 | 1,5 | 1,2 |
| 18 : 0 | 12,6 | 31 | 48 | 5,9 | 16,5 |
| 18 : 1 | 28,2 | 26,8 | 14,8 | 36,5 | 15,7 |
| 18 : 2 | 7 | 4,8 | 2,5 | 7,5 | 6,5 |
| 18 : 3 | 1,4 | - | - | - | - |
| 20 : 0 | traces | traces | traces | traces | traces |
| 20 : 1 | traces | traces | traces | traces | - |
| 20 : 2 | 2 | - | 1 | - | - |
| 20 : 3 | traces | traces | traces | traces | - |
| 20 : 4 | 13,4 | 14 | 10 | 2,2 | 0,5 |
| 20 : 5 ou 6 | - | 2,4 | - | - | - |
| 22 : 0 | traces | - | - | - | - |
| 23 : 0 | traces | - | - | - | - |
| 24 : 0 | 0,9 | - | - | - | - |
| 24 : 1 | 1,2 | - | - | - | - |
| 25 : 0 | traces | - | - | - | - |
| 26 : 0 | traces | - | - | - | - |
| Saturés | 46,8 | 52 | 70,5 | 52,3 | 76,1 |
| Insaturés | 53,2 | 48 | 29,5 | 47,7 | 23,9 |

TABLEAU 19

Pourcentages des acides gras des phospholipides totaux et des principaux phospholipides de la médullaire du rein humain.

| Acides | Zone corticale | | Zone médullaire | |
|---|---|---|---|---|
| | Sphingo I | Sphingo II | Sphingo I | Sphingo II |
| 14 : 0 | 1,4 | 1,6 | 1,7 | |
| 16 : 0 | 26 | 63,4 | 11,7 | 58 |
| 16 : 1 | 5,4 | 0,7 | 1,3 | traces |
| 18 : 0 | 8,2 | 15 | 8,9 | 17,1 |
| 18 : 1 | 10,4 | 9,3 | | 8,0 |
| 18 : 2 | traces | - | 0,8 | traces |
| 18 : 3 | - | - | 1,3 | traces |
| 20 : 0 | traces | 4,2 | 1,7 | 5,8 |
| 20 : 1 | traces | traces | 1 | traces |
| 20 : 2 | traces | traces | 2 | traces |
| 20 : 3 | - | - | - | - |
| 20 : 4 | - | - | - | - |
| 22 : 0 | 9,9 | 2,1 | 16,5 | 7,6 |
| 23 : 0 | 1,2 | - | traces | traces |
| 24 : 0 | 18,5 | 3,5 | 19,8 | 2,3 |
| 24 : 1 | 19,0 | traces | 21,4 | 1,2 |
| 25 : 0 | traces | - | traces | - |
| 26 : 0 | traces | - | traces | - |
| Saturés | 65,2 | 89,8 | 61,3 | 90,8 |
| Insaturés | 34,8 | 10,2 | 38,7 | 9,2 |

TABLEAU 20

Pourcentages des acides gras des deux groupes sphingomyéliniques (I de Rf = 0,41, II de Rf = 0,35) du cortex et de la médullaire.

La répartition des acides gras est très différente dans les deux sphingomyélines :

- le groupe I contient surtout les acides béhénique, lignocérique et nervonique,
- le groupe II renferme surtout de l'acide palmitique.

# II - ETUDE METABOLIQUE

L'injection de $^{32}P$ à des rats nous permet d'approfondir l'étude du métabolisme des phospholipides dans le tissu rénal.

Le turnover des phospholipides totaux et des différents phospholipides est déterminé en fonction du temps.

Les rats sont sacrifiés respectivement 6, 8, 14 et 38 heures après l'injection de $^{32}P$.

## 1 - autoradiogrammes

Les autoradiogrammes permettent une étude qualitative de l'incorporation dans les divers phospholipides.

Un dosage préalable de phosphore nous a permis de déposer pour chaque temps, une quantité égale de phospholipides totaux.

Les chromatographies en couche mince monodimensionnelles sont effectuées dans le solvant neutre ; celles en bidimensionnelles, d'abord dans le solvant alcalin puis dans le solvant neutre, qui permettent de distinguer : lysophosphatidylcholines, sphingomyélines, phosphatidylsérines, acides phosphatidiques, phosphatidylcholines, cardiolipides, phosphatidyléthanolamines.

L'autoradiogramme (fig. 9) révèle :

- un marquage des phospholipides à l'exception des acides phosphatidiques,
- un marquage plus intense à 8 heures pour les phosphatidylcholines et phosphatidyléthanolamines,
- les sphingomyélines présentent une incorporation progressive en fonction du temps,
- les lysophosphatidylcholines, phosphatidylsérines et cardiolipides sont plus faiblement marquées.

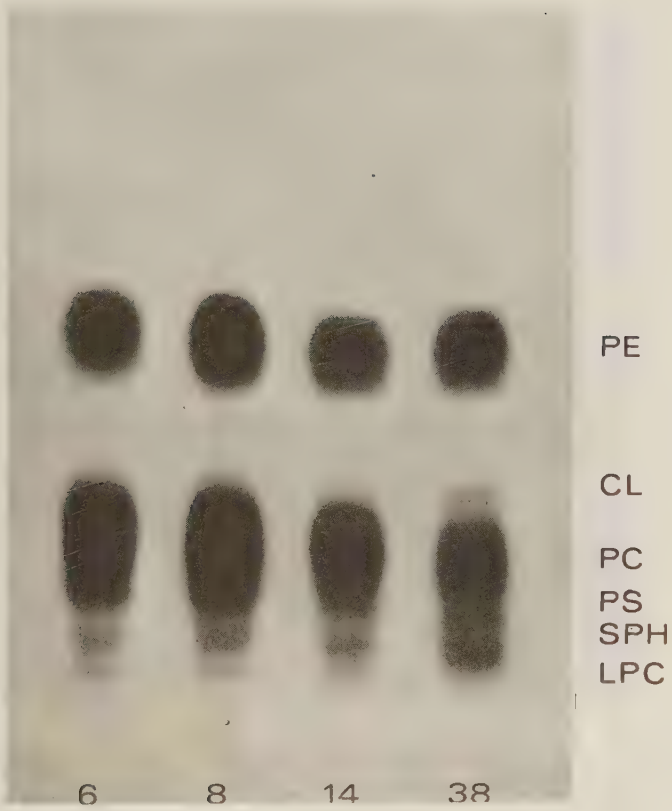


FIG. 9 - Autoradiogramme après chromatographie en couche mince sur silicagel G Merck des phospholipides de rein de rat.

Quantité de P déposée : 22 µg.

Solvant : chloroforme-méthanol-eau (65-25-4, v/v).

LPC : lysophosphatidylcholines.
CL : cardiolipides.
SPH : sphingomyélines.
PS : phosphatidylsérines.
PE : phosphatidyléthanolamines.
PC : phosphatidylcholines.

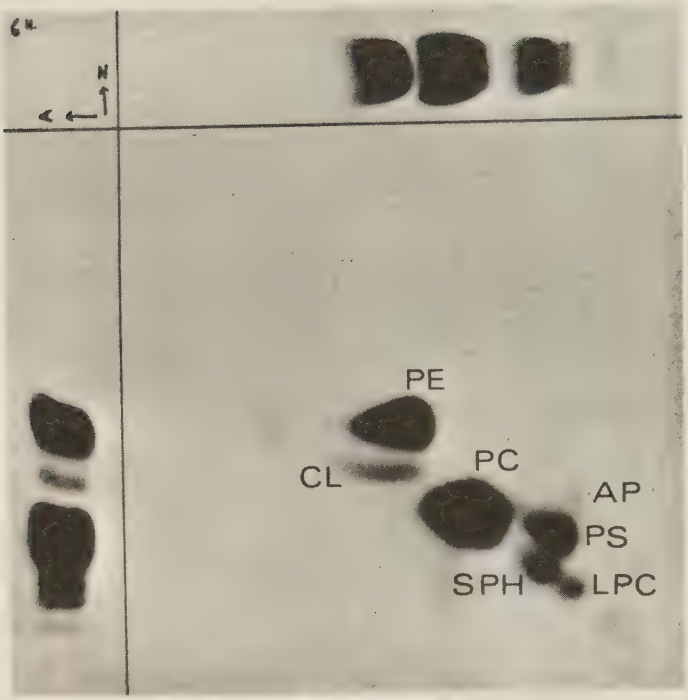


FIG. 10 - Autoradiogramme après chromatographie bidimensionnelle en couche mince sur silicagel G Merck des phospholipides de rein de rat.

Quantité de P déposée : 24 µg.

1° dimension : chloroforme-méthanol-ammoniaque (65-35-5, v/v).

2° dimension : chloroforme-méthanol-eau (65-25-4, v/v.

LPC : lysophosphatidylcholines.

CL : cardiolipides.

SPH : sphingomyélines.

PS : phosphatidylsérines.

PE : phosphatidyléthanolamines.

PC : phosphatidylcholines.

AP : acides phosphatidiques.

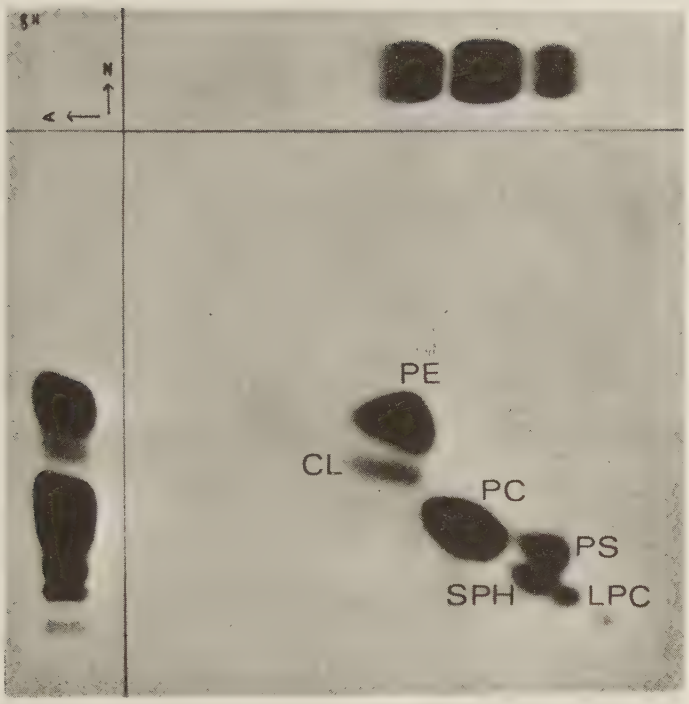


FIG. 11 - Autoradiogramme après chromatographie bidimensionnelle en couche mince sur silicagel G Merck des phospholipides de rein de rat. Quantité de P déposée : 22 µg.
1° dimension : chloroforme-méthanol-ammoniaque (65-35-5, v/v).
2° dimension : chloroforme-méthanol-eau (65-25-4, v/v).

LPC : lysophosphatidylcholines.
CL : cardiolipides.
SPH : sphingomyélines.
PS : phosphatidylsérines.
PE : phosphatidyléthanolamines.
PC : phosphatidylcholines.

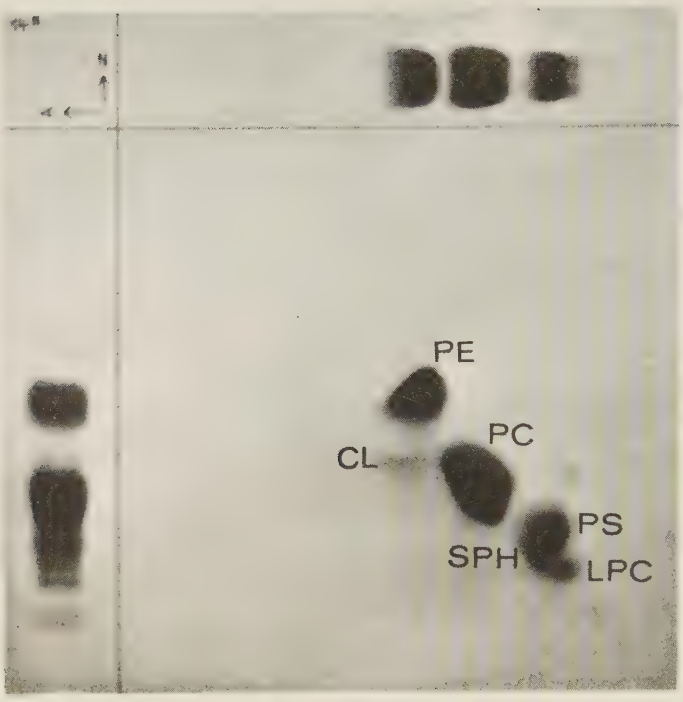


FIG. 12 - Autoradiogramme après chromatographie bidimensionnelle en couche mince sur silicagel G Merck des phospholipides de rein de rat.

Quantité de P déposée : 26 µg.

1° dimension : chloroforme-méthanol-ammoniaque (65-35-5, v/v).

2° dimension : chloroforme-méthanol-eau (65-25-4, v/v).

LPC : lysophosphatidylcholines.

CL : cardiolipides.

SPH : sphingomyélines

PS : phosphatidylsérines.

PE : phosphatidyléthanolamines.

PC : phosphatidylcholines.

AP : acides phosphatidiques.

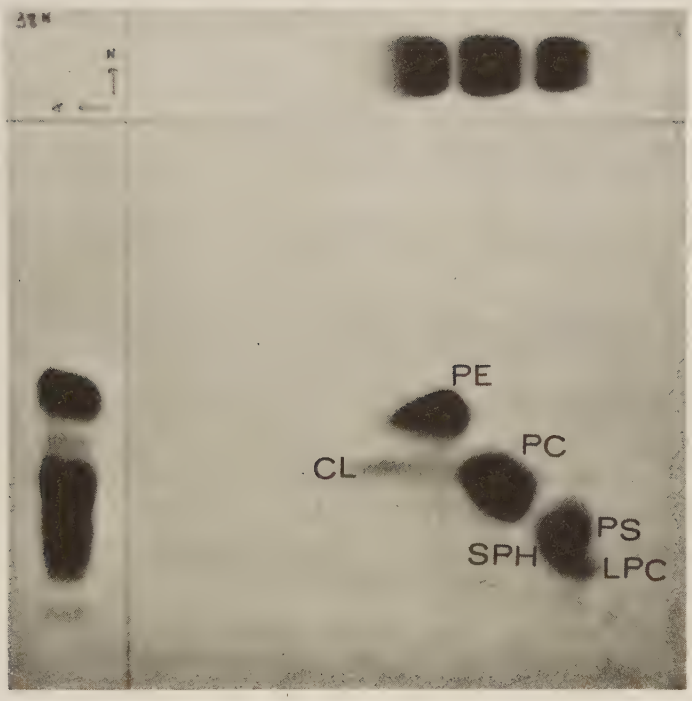


FIG. 13 - Autoradiogramme après chromatographie bidimensionnelle en couche mince sur silicagel G Merck des phospholipides de rein de rat.

Quantité de P déposée : 31 µg.

1° dimension : chloroforme-méthanol-ammoniaque (65-35-5, v/v).

2° dimension : chloroforme-méthanol-eau (65-25-4, v/v).

LPC : lysophosphatidylcholines.
CL : cardiolipides.
SPH : sphingomyélines.
PS : phosphatidylsérines.
PE : phosphatidyléthanolamines.
PC : phosphatidylcholines.

Les autoradiogrammes des chromatographies bidimensionnelles (fig.10, 11, 12, 13) nous détaillent beaucoup plus l'incorporation de $^{32}P$ dans certains phospholipides en permettant de mieux les séparer :

- cardiolipides,
- phosphatidylsérines,
- lysophosphatidylcholines.

## 2_mesures des activités spécifiques

Nous déterminons quantitativement l'incorporation de $^{32}P$ dans les phospholipides par le calcul de l'activité spécifique exprimée en coups par minute par µg de phosphore.

Ces valeurs, rapportées dans le tableau 21 et illustrées par les courbes de la fig. 14 mettent en évidence :

- une incorporation maximale dans les phospholipides totaux, huit heures après l'injection ; de même, les phosphatidylcholines présentent un pic très prononcé indiquant une activité métabolique intense.

| Temps (heures) | PL totaux | LPC (1) | SPH (2) | PS (3) | PC (4) | CL (5) | PE (6) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 6 | 1660 | 1120 | 410 | 1220 | 3280 | 600 | 1180 |
| 8 | 2300 | 1205 | 520 | 1330 | 3700 | 740 | 1685 |
| 14 | 1270 | 1770 | 500 | 1240 | 2140 | 875 | 1720 |
| 38 | 1190 | 1650 | 920 | 1275 | 2170 | 865 | 1560 |

TABLEAU 21

Activités spécifiques (coups/min./µg de P) de l'extrait lipidique total et des divers phospholipides isolés après chromatographie en couche mince.

1 = Lysophosphatidylcholines ; 2 = Sphingomyélines ;
3 = Phosphatidylsérines ; 4 = Phosphatidylcholines ;
5 = Cardiolipides ; 6 = Phosphatidyléthanolamines.

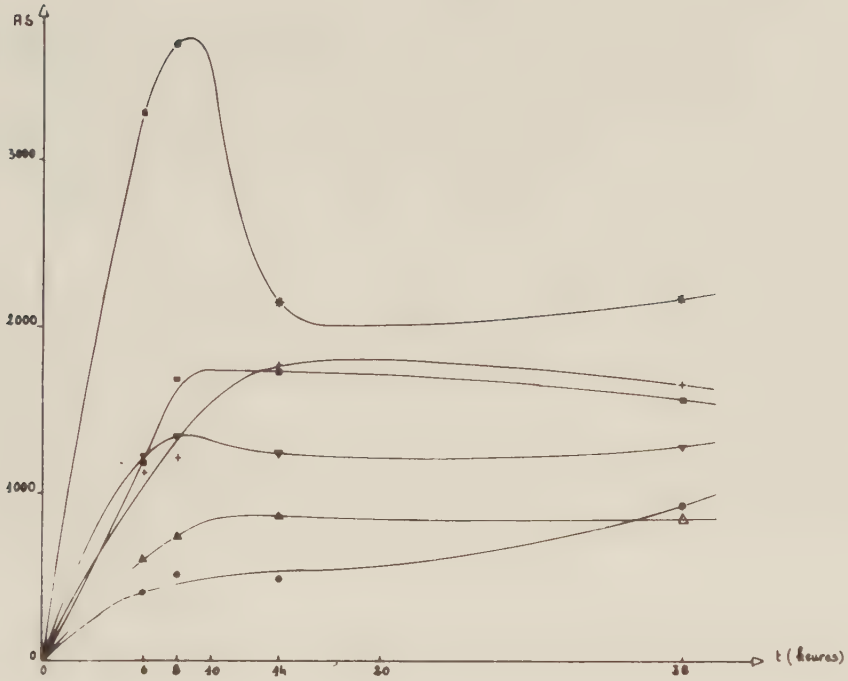


FIG. 14 - Activités spécifiques des divers phospholipides de rein de rat.

- CL : cardiolipides.
- PS : phosphatidylsérines.
- SPH : sphingomyélines.
- PE : phosphatidyléthanolamines.
- PC : phosphatidylcholines.
- LPC : lysophosphatidylcholines.

- les sphingomyélines incorporent $^{32}P$ plus lentement que les autres fractions et il serait intéressant d'étudier pour ce phospholipide une incorporation en fonction de temps plus longs.

- les phosphatidyléthanolamines et phosphatidylsérines présentent toutes deux une activité maximale au bout de 8 heures ; au-delà de ce temps, celle-ci demeure stationnaire.

- les lysophosphatidylcholines présentent un degré d'incorporation important dont le maximum, à l'inverse des autres phospholipides se situe au bout de 14 heures ; au-delà de ce temps, leur activité décroît lentement.

CHAPITRE III

# DISCUSSION DES RESULTATS

Les diverses techniques de séparation des lipides utilisées : chromatographie sur colonne d'acide silicique et sur couche mince de silicagel ainsi que les dosages chimiques du phosphore lipidique et du cholestérol, nous ont permis d'évaluer dans le cortex et la médulla de rein humain et dans le rein de rat les différents constituants lipidiques

Nos valeurs pour les lipides totaux et les phospholipides sont en accord avec les résultats de ROUSER et coll. ( 27 ), par contre les taux de phospholipides du rein de rat rapportés par FEWSTER et coll. ( 24 ) sont plus élevés que les notres.

Dans l'analyse des divers phospholipides de rein humain, nos résultats s'accordent avec ceux de ROUSER à l'exception des phosphatidylcholines pour lesquelles nous trouvons un pourcentage plus élevé.

Pour les phospholipides du rein de rat, nos résultats sont également en accord avec ceux de ROUSER mais en nette contradiction avec MARINETTI, ERBLAND et STOTZ ( 29 ) qui décèlent des taux élevés de lysophosphatidylcholines et de sphingomyélines et des valeurs nettement plus faibles pour les phosphatidyléthanolamines.

Il faut remarquer que le pourcentage des lysophosphatidylcholines chez le lapin et le rat est quatre fois plus faible que chez l'homme ; seul MARINETTI et coll. citent une valeur très élevée. Ces auteurs observent d'ailleurs ( 82 ) que lorsque les lipides sont extraits par le mélange alcool-éther le taux des lysophosphatidylcholines est plus élevé que lors de l'extraction par le mélange chloroforme-méthanol. Il s'agit peut-être d'une stimulation des phospholipases comme l'a montré HANAHAN ( 122 ).

Nous donnons pour le cardiolipide chez le rat des valeurs légèrement plus élevées que celles indiquées par la plupart des auteurs.

Par chromatographie en phase gazeuse nous avons analysé les acides gras libres et les acides gras des principaux lipides du tissu rénal.

1 - ACIDES GRAS LIBRES.

Nous trouvons parmi les acides gras libres du rein humain surtout les acides palmitique, stéarique, oléique et une quantité appréciable d'acide linoléique ; BURNS et ELWOOD ( 32 ) chez le rat indiquent ces acides gras majeurs avec des pourcentages inverses par rapport aux acides gras du rein humain en ce qui concerne les acides stéarique et oléique ; de plus, il ne cite pas la présence d'acide arachidonique (7 % dans le rein humain).

2 - TRIGLYCERIDES.

Comme chez le rat d'après LEVY (25 ), deux acides gras dominent : les acides palmitique et oléique, par contre en ce qui concerne les acides stéarique et linoléique, les valeurs sont nettement plus élevées chez le rat.

3 - PHOSPHOLIPIDES.

Dans les phospholipides totaux des reins d'homme et de rat nous observons des valeurs très similaires pour les principaux acides gras. En accord avec les travaux antérieurs, nous trouvons un taux élevé d'acide arachidonique.

Les acides gras des phosphatidylcholines selon KUKSIS et coll. ( 33 ) chez le rat ont des compositions éloignées de ceux des phosphatidylcholines rénales humaines pour les acides oléique, linoléique et arachidonique.

Les valeurs différentes données pour les lipides totaux, les phospholipides et d'autres fractions par les divers auteurs et nous-mêmes peuvent en partie provenir des techniques utilisées :

- techniques d'extraction des lipides totaux,
- techniques de purification et de fractionnement,

et techniques de dosage enfin.

Notre étude métabolique est à comparer avec les travaux de MARINETTI et coll. ( 82 ) et ceux de TINKER et HANAHAN ( 30 ).

MARINETTI a étudié le métabolisme des phospholipides in vivo par injection de $^{32}P$ chez le rat par voie sous cutanée ; nos recherches sur ce

métabolisme après injection du radioélément par voie intrapéritonéale, sont en accord dans l'ensemble avec ses résultats.

Nous observons pour les phosphatidylcholines, un maximum d'incorporation huit heures après l'injection du $^{32}P$ légèrement plus précoce que celui indiqué par MARINETTI probablement à cause de la voie d'injection.

Leur fort marquage au bout de huit heures décroît notablement dès la quatorzième heure puis croît à nouveau très légèrement jusqu'à trente huit heures.

Les lysophosphatidylcholines présentent un maximum d'incorporation au bout de quatorze heures, celui-ci décroît ensuite progressivement jusqu'à trente huit heures

Les phosphatidyléthanolamines et les phosphatidylsérines, séparées des autres phospholipides grâce à la chromatographie en couche mince bidimensionnelle, montrent malgrè leurs activités spécifiques différentes, certaines analogies dans l'incorporation du $^{32}P$ : un maximum de marquage au bout de huit heures puis des valeurs qui changent peu jusqu'à trente huit heures. Ces résultats s'accordent avec ceux de MARINETTI et coll. ( 82 ).

Enfin, cardiolipides et sphingomyélines présentent tous deux des activités spécifiques faibles mais des courbes d'incorporation très différentes, s'accordant avec les résultats de TINKER et HANAHAN ( 30 ) : un diagramme plat pour les cardiolipides indiquant un métabolisme peu actif ; par contre un marquage qui s'accentue avec le temps pour les sphingomyélines dont le métabolisme est lent et progressif.

Les activités spécifiques des sphingomyélines correspondent à l'ensemble des deux groupes, différant l'un de l'autre comme nous l'avons montré par leur composition en acides gras ; mais on remarque sur la fig. 9 que la fraction la plus active et dont le marquage est progressif est celle qui en chromatographie en couche mince présente le Rf le plus faible. Cette constatation est en accord avec les travaux de MINARI et coll. ( 123 ).

Nous remarquerons enfin que sur nos autoradiogrammes les acides phosphatidiques apparaissent très faiblement radioactifs. Ceci est en accord avec les théories de biosynthèse des phospholipides, faisant jouer aux acides phosphatidiques un rôle important de précurseurs.

Ces composés apparaissent très rapidement marqués et peuvent servir d'intermédiaire pour la synthèse des glycérophospholipides.

Le $^{32}P$ injecté peut être incorporé dans les phospholipides selon deux voies métaboliques :

- par l'intermédiaire des acides phosphatidiques,

ou par l'intermédiaire des nucléotides libres.

Ces deux mécanismes s'accomplissant dans des temps très courts expliquent sur nos courbes la phase ascensionnelle observée pour la plupart des phospholipides et antérieure à six heures.

Notre expérimentation ne permet pas de donner la prédominance à l'une ou l'autre de ces deux voies.

Par contre il nous semble que l'examen des courbes correspondant aux phosphatidylcholines et aux lysophosphatidylcholines au delà de quatorze heures : décroissance de la radioactivité des lysophosphatidylcholines et croissance de celle des phosphatidylcholines peut expliquer deux voies secondaires du métabolisme des glycérophospholipides:

1) Transfert d'un acide gras en présence de transacylase sur une lysophosphatidylcholine pour former une phosphatidylcholine.

2) Echange d'un acide gras entre deux molécules de lysophosphatidylcholines pour former : glycérophosphorylcholine et phosphatidylcholine.

Notre étude métabolique des phospholipides rénaux, en accord avec les travaux antérieurs, mériterait d'être approfondie :

- dans des temps plus courts pour préciser le rôle des acides phosphatidiques,

et dans des temps plus longs pour étudier tout spécialement le turnover des sphingomyélines.

Nous l'avons abordée dans le but de mieux connaître le rôle des lipides dans le fonctionnement rénal et d'expliquer leur intervention dans les complications pathologiques de ce fonctionnement.

# CONCLUSION

Les différentes techniques adoptées :

- chromatographie en couche mince,
- chromatographie en phase gazeuse,
- dosage de P,
- injection de radioisotopes,

nous ont permis d'effectuer l'analyse des phospholipides et de leurs acides gras dans les zones corticale et médullaire du rein humain, de connaître la composition des phospholipides du rein et d'établir le turnover de phosphore radioactif dans les différents phospholipides du rein de rat.

## 1 - REIN HUMAIN.

Les lipides neutres et les phospholipides sont plus importants dans le cortex que dans la médulla ; pour les lipides non phosphorés, le cholestérol sous forme libre est le plus abondant surtout dans la zone corticale.

La chromatographie en couche mince nous permet un fractionnement des phospholipides en :

- cardiolipides,
- lysophosphatidylcholines,
- sphingomyélines,
- phosphatidylsérines,
- phosphatidylcholines,
- phosphatidyléthanolamines,

et les pourcentages de ces différentes fractions nous sont donnés grâce au dosage de phosphore. Nous remarquons un taux particulièrement élevé de phosphatidylcholines.

Dans les phospholipides totaux, les proportions d'acides gras saturés et insaturés sont très voisines avec prédominance des acides palmitique, stéarique, oléique et arachidonique.

L'analyse des acides gras des diverses fractions permet de noter des différences :

les acides gras saturés prédominent dans les phosphatidylsérines et les lysophosphatidylcholines (70,5 et 76,1 p. 100 respectivement).

l'acide arachidonique se rencontre essentiellement dans les phosphatidyléthanolamines et les phosphatidylsérines.

Dans les lysophosphatidylcholines, le pourcentage des acides saturés est trois à quatre fois plus élevé que celui des acides insaturés, avec une prédominance de l'acide palmitique.

Aucun glycérophospholipide ne renferme d'acides gras à plus de 20 atomes de carbone alors que les sphingomyélines contiennent des acides béhénique, lignocérique et nervonique.

2 - REIN DE RAT.

Les pourcentages des phospholipides présentent une certaine similitude avec ceux du rein humain.

L'injection de $^{32}P$ à des rats que nous sacrifions à temps différents nous a permis une étude du métabolisme des phospholipides :

- qualitativement, grâce aux autoradiogrammes après chromatographie en couche mince ; la migration bidimensionnelle nous a permis une meilleure séparation de certains phospholipides.

- quantitativement, par dosage de phosphore et comptage des différentes taches recueillies sur les chromatographies, nous avons déterminé l'activité spécifique de chaque phospholipide. Les courbes montrent :

. une activité métabolique intense pour les lécithines avec un maximum d'incorporation 8 heures après l'injection, suivie d'une décroissance d'abord rapide puis progressive.

. des activités métaboliques moins importantes pour les phosphatidyléthanolamines, les phosphatidylsérines et les lysophosphatidylcholines ; leur activité maximale varie entre 8 heures et 14 heures et reste en plateau.

. un degré de marquage faible et croissant en fonction du temps pour les sphingomyélines et les cardiolipides.

# BIBLIOGRAPHIE

1 - LANGE C. F. and MARKOWITZ A. S. - Chemistry of whole human glomerular basement membranes and of a soluble fraction prepared by tripsinization. Biochem. Biophys. Acta, 1965, 101(2), 217.

2 - DISCHE R. M., PAPPAS G. D., GRAUER A. and DISCHE Z. - The carbohydrate of basement membranes of human kidney glomeruli. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1965, 20(1), 63.

3 - SCHWARZMAN - Electrophorèse en gel d'amidon des protéines tissulaires. Rev. franç. étud. clin. biol., 1959, 4, 265.

4 - GROUCHY J. de - Protéines et enzymes tissulaires, une étude par électrophorèse en gel d'amidon. Rev. franç. étud. clin. biol., 1960, 5, 286.

5 - BERNSOHN J. - Separation of brain proteins by starch gel electrophoresis. Proc. Soc. exp. biol., 1961, 107, 773.

6 - DEBRAY-SACHS H. - Etude des protéines hydrosolubles du tissu rénal par électrophorèse en gel d'amidon. Thèse pharmacie Paris 1963. IIe Congrès Int. Nephrologie, Prague 1963. 1 vol. Amsterdam 1965, excerpta medica éd., p. 495.

7 - SOTIROV N. - Izv. Inst. Sravnitelna. Patol. Zhivotn. Bulgarie. Akad. Nauk. 1965, 11, 195. Electrophoretic fraction of kidney soluble proteins in some animal species in C. A., 1966, V° 64, N° 11(16.373).

8 - BRUCKHAUSER F. V. and MERKER H. J. - Preparation and morphological characterization of the basement membrane fraction of the rat kidney cortex. Arch. Exptl. Pathol. Pharmakol., 1965, 251(1), 1.

9 - AKIRA MAKITA - Saishin Igaku, 1964, 19, 2877. Saccharides in kidney in C. A., 1965, vol. 62, N° 8, 9534 g.

10 - TWARDOSZ W. and ROSSOWKI W. - Glycogen and mucopolysaccharides during the development of rabbit kidneys. Folia Morphol. 1964, 15(2), 113.

11 - ALLALOUF D. and SHARON N. - Fractionation of acid polysaccharides in rat kidneys. Bull. Res. Council Israël, sect. E., 1963, 10(3-4), 197.

12 - ALLALOUF D. - Anticoagulant properties of an acid mucopolysaccharide preparation isolated from rat kidney. Thromb. diath. Hoemouh., 1967, 17(12), 264.

13 - PINTER G. G. - A possible role of acid mucopolysaccharides in the urine concentrating process. Experientia, 1967, 23(2), 100.

14 - BENARD H. et GAJDOS A. - Activité métabolique du rein et son rôle dans l'excrétion urinaire. 1 vol. Paris 1954 Masson et Cie éd.

15 - BASTIDE J. - Contribution à l'étude critique et expérimentale des activités enzymatiques rénales. Thèse (Doct. Pharmacie) - Clermont-Ferrand - Février 1968.

16 - MIGONE L. - Renal metabolic disturbances during shock in C. R., 1° Congrès Int. Nephrologie Genève - Evian 1960, 1 vol., Bâle, 1961, Karger, éd. p. 184.

17 - POLLAK V. E. and MATTENHEIMER H. - Enzyme activity in the nephron. Arch. int. Méd., 1962, 109, 473.

18 - WACHSTEIN M. et BRADSHAW M. - Histochemical localization of enzyme activity in the kidneys of three mammalian species during their postnatal development. J. Histochem. Cytochem., 1965, 13(1), 44.

19 - ROYER P. - L'enzymologie dans les maladies du rein chez l'enfant. In enzymology 1 vol. Paris 1964, p. 353.

20 - JASMIN G. - Enzymic histochemistry of the rat nephron (Univ. Montréal Can) Acta Histochem., 1967, 26(1), 160.

21 - PASCALE A. de et PULILO E. - Acta Poediat. Lat. 1966, 19(5), 407. Histochemical behavior of lysosomes in rat kidney, from fetus to adult in C. A., 1967, vol. 66, N° 8, 63145 j.

22 - REGOLI D., HESS R., BRUNNER H., PETERS G. and CROSS F. - Interrelation of renin content in kidneys and blood pressure in renal hypertensive rats. Arch. Intern. Pharmacodyn., 1962, 140, 416.

23 - SUBHA SEN, SMEBY R. R. and BUMPUS F. M. - Antihypertensive effect of an isolated phospholipid. Amer. J. Physiol., 1968, 214(2), 337.

24 - FEWSTER M. E., NYC J. F. and GRIFFITH W. H. - Renal lipid composition of choline deficient rats. J. Nutr., 1966, 90(3), 252.

25 - LEVY R. - Lipid pattern in rat kidney. Renal metabolism and epidemiology of some renal diseases, éd. by Jack Metcoffin, 1964.

26 - MORGAN T. E., TINKER D. O. and HANAHAN D. J. - Phospholipid metabolism in kidney. I - Isolation and identification of lipids of rabbit kidney. Arch. Biochem. Biophys., 1963, 103, 54.

27 - ROUSER G., SIMON G. and KRITCHEVSKY G. - Species variations in phospholipid class distribution of organs. Lipids, 1969, vol. 4, N° 6, 599.

28 - GOLD M. - An investigation of the lipid metabolism of dog kidney medulla and cortex. Lipids, 1969, vol. 5, N° 3, 293.

29 - MARINETTI G. V., ERBLAND J. and STOTZ E. - The phosphatide composition of rat tissues. Biochim. Biophys. Acta, 1958, 30, 642.

30 - TINKER D. O., HANAHAN D. J. - Phospholipid metabolism in kidney. III - Biosynthesis of phospholipids from radioactive precursors in rabbit renal cortex slices. Biochemistry, 1966, 5( 2), 423.

31 - GETZ G. S., BARTLEY W., LURIE D. and NOTTON B. H. - The phospholipids of various sheep organs, rat liver and of their subcellular fractions. Biochim. Biophys. Acta, 1968, 152, 325.

32 - BURNS B. J. and ELWOOD J. C. - Lipid metabolism in kidney and liver tissue from normal and diabetic rats. Biochim. Biophys. Acta, 1969, 187, 307.

33 - KUKSIS A., BRECKENRIDGE W. C., MARAI L. and STACHNYK O. - Molecular species of lecithins of rat heart, kidney and plasma. J. Lipid Research., 1969, 10, 25.

34 - GLENDE E. A. and CORNATZER W. E. - The phospholipid fatty acid composition of liver, kidney, heart and spleen mitochondria from rats of various âge groups. Biochim. Biophys. Acta, 1966, 125, 310.

35 - LANDSTEINER K. and LEVENE P. A. - J. Biol. Chem., 1925, 10, 731. dans "les sulfatides (structure - biosynthèse métabolique)" par J. RICHARD-Biologie médicale, 1965, N° 5, 540.

36 - GREEN J. P. and ROBINSON J. P. - Cerebroside sulfate (sulfatide A) in some organs of the rat and in mast cell tumor. J. Biol. Chem., 1960, 235, 1621.

37 - SVENNERHOLM L. - Some aspects of the biochemical changes in leucodystrophy. in "Folch J. et Bauer H. J. - Brain lipids and lipoproteins and the leucodystrophies, 104". Elsevier, Amsterdam, 1963.

38 - MARTENSSON E. - Sulfatides of human kidney isolation, identification and fatty acid composition. Biochim. Biophys. Acta, 1966, 116, 521.

39 - STOFFYN A., STOFFYN P. and MARTENSSON E. - Structure of kidney ceramide dihexoside sulfate. Biochim. Biophys. Acta, 1968, 152, 353.

40 - AUSTIN J. H. - Metachromatic sulfatides in cerebral white matter and kidney. Proc. Soc. Exp. Biol., (N. Y.), 1959, 100, 361.

41 - AUSTIN J. H. - Metachromatic from of diffuse cerebral sclerosis. III - Significance of sulfatides and other lipid abnormalities in white matter and kidney. Neurology, 1960, 10, 470.

42 - KAWANAMI J. - Glycolipids from rat kidney. J. Biochem. (Tokyo) 1968, 64(5), 625.

43 - MAKITA A. - Biochemistry of organ glycolipids. II - Isolation of human kidney glycolipids. J. Biochem. (Tokyo), 1964, 55, n° 3, 269.

44 - MAKITA A. and YAMAKAWA T. - Biochemistry of organ glycolipids. III - The structures of human kidney cerebroside sulfuric ester, ceramide dihexoside and ceramide trihexoside. J. Biochem. (Tokyo), 1964, 55, n° 4, 365.

45 - WHERRET J. R. and CUMMINGS J. N. - Detection and resolution of gangliosides in lipid extracts by thin-layer chromatography. Bioch. J., 1963, 86, 378.

46 - PURO K., MAURY P. and HUTTUNEN J. K. - Qualitative and quantitative patterns of gangliosides in extraneural tissues. Biochim. Biophys. Acta, 1969, 187, 230.

47 - PURO K. - Carbohydrate components of bovine kidney gangliosides. Biochim. Biophys. Acta, 1969, 189, 401.

48 - PURO K. and KERANEN A. - Fatty acids and sphingosines of bovine kidney gangliosides. Biochim. Biophys. Acta, 1969, 187, 393.

49 - CARTER H. E. and HIRSCHBERG C. B. - Phytosphingosines and branched sphingosines in kidney. Biochemistry, 1968, 7, 2296.

50 - KARLSSON K. A., SAMUELSSON K. and STEEN E. O. - Studies on sphingosines. XIII. The existence of phytosphingosine in bovine kidney sphingomyelins. Biochim. Biophys. Acta, 1968, 152, 798.

51 - MICHALEC C. and KOLMAN Z. - The phytosphingosine content of the human kidney glycolipids. Clin. Chim. Acta, 1966, 13, 529.

52 - BARENHOLZ Y. and GATT S. - Separation of sphingosine, dihydrosphingosine and phytosphingosine by chromatography on columns of silica gel. Biochim. Biophys.Acta, 1968, 152, 790.

53 - KARLSSON K. A. and MARTENSSON E. - Studies on sphingosines. XIV. On the phytosphingosine content of the major human kidney glycolipids. Biochem. Biophys. Acta, 1968, 152, 230.

54 - DEIBERT K. und JUCHEMS R. - Muenchen. Med. Wochensch., 1966, 108(49), 2495. Increase of glomerular filtration by phospholipids in C. A. 1967, vol. 66, n° 4, 27655s.

55 - MALILA A., de MARTINIS F. D. and MASORO E. S. - Involvement of phospholipids in Rb+ transport by kidney cortex tubules. J. Biol. Chem., 1968, 243(23), 6115.

56 - TINKER D. O., KOCH A. et HANAHAN D. J. - Phospholipid metabolism in kidney. II. Potassium uptake, lipid composition and $^{32}P$ labeling of the phospholipids in rabbit kidney cortex slices in vitro and the effects of diphenylhydantoin. Arch. Biochem. Biophys., 1963, 103(1), 66.

57 - HOKIN M. R. and HOKIN L. E. - The synthesis of phosphatidic acid from diglyceride and adenosine triphosphate in extracts of brain microsomes. J. Biol. Chem., 1959, 224, 1381.

58 - HOKIN L. E. and HOKIN M. R. - The turnover of phosphatidic acid and phosphoinositides in the avian salt gland on stimulation of secretion. J. Gen. Physiol., 1960, 44, 61.

59 - HOKIN L. E. and HOKIN M. R. - Diglyceride-kinase and phosphatidic acid phosphatase in erythrocyte membranes. Nature, (London), 1961, 189, 836.

60 - HOKIN M. R. and HOKIN L. E. - in R. M. C. Dawson and D. N. Rhodes (editors), Metabolism and physiological significance of lipids, John Wiley and Sons, Ltd p. 423 (1964).

61 - LASSEN N. A., MUNCK O. and THAYSEN J. H. - Oxygen consumption and sodium reabsorption in the kidney. Acta Physiol. Scand., 1961, 51, 371.

62 - HOKIN M. R. and HOKIN L. E. - Further evidence for phosphatidic acid as the sodium carrier. Nature (London), 1961, 190, 1016.

63 - HOKIN L. E. and HOKIN M. R. - Phosphatidic acid metabolism and active transport of sodium. Symposium on borderline problems around the field of active transport. Fed. Proc., 1963, 8, 22.

64 - LUBOCHINSKY B., MEURY J. et STOLKOWSKI J. - Transport du potassium et synthèse des phospholipides chez l'Escherichia coli : I - Les phospholipides des souches B 163 et B 525. Bull. Soc. Chim. Biol., 1965, 47, 1529.

65 - LUBOCHINSKI B., MEURY J. et STOLKOWSKI J. - Transport du potassium et synthèse des phospholipides chez l'Escherichia coli : II - Cinétiques comparées de l'incorporation du $^{32}P$ phosphate dans les phospholipides et du transport simultané de $K^+$ dans les souches B 163 et B 525. Bull. Soc. Chim. Biol., 1966, 48, 873.

66 - OLSON J. A. - Lipid metabolism. Ann. Review. of Biochemistry, 1966, 35(II), 589.

67 - STARER-MENDES H., LUBOCHINSKY B. and STOLKOWSKI J. - The transport of potassium and the synthesis of phospholipid in slices of guinea pig renal cortex. J. Physiol., 1968, 60, 67.

68 - MARINETTI G. V., ERBLAND J., ALBRECHT M. and STOTZ E. - The in vitro incorporation of $^{32}P$ labelled orthophosphate into the phosphatides of isolated rat liver mitochondria. Biochim. Biophys. Acta, 1957, 26, 130.

69 - MARINETTI G. V., ERBLAND J. and STOTZ E. - Phosphatides of pig heart cell fractions. J. Biol. Chem., 1958, 233, 562.

70 - MARINETTI G. V., ERBLAND J., KOCHEN J. and STOTZ E. - The phosphatide composition of a purified cytochrome oxidase preparation. J. Biol. Chem., 1958, 233, 740.

71 - CONOVER T. E., MARINETTI G. V., WITTER R. F. and STOTZ E. - The incorporation of $^{32}P$-orthophosphate into a specific lipid fraction and into adenine nucleotides of mitochondria during oxidative phosphorylation. Biochim. Biophys. Acta, 1960, 41, 264.

72 - JUSTIN-BESANCON L. - Les fonctions internes du rein. 1 vol., Paris 1929, p. 370, Masson et Cie, éd.

73 - ROGER H., BINET L. et FABRE R. - De l'action des divers tissus sur les graisses in vitro. C. R. Soc. Biol., (Paris) 1927, 96, 377.

74 - SNAPPER I. and GRANBAUM A. - The non excretory functions of the kidney. In Berglund et coll., The kidney in health and disease, 1 vol., Philadelphie, 1935, Lea and Febiger, éd. p. 183.

75 - VERNE J., HEBERT S. and CHAPPAL O. - Etude cytochimique de l'apparition de l'activité des estérases au cours du développement chez le rat blanc. C. R. Soc. Biol. (Paris) 1952, 146, 176.

76 - HOLLENBERG C. H. and HOROWITZ I. - The lipolytic activity of rat kidney cortex and medulla. J. Lipid Research., 1962, 3, 445.

77 - REUBI F. et SCHMID A. - L'hyperlipidémie du syndrome nephrotique est-elle d'origine rénale ? J. mol. méd. chir. 1955, 61, 304.

78 - CHERNICK S. S., MASORO E. J. and CHAIKOFF I. L. - The in vitro conversion of $^{14}C$-labelled glucose to fatty acids. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 1950, 73, 348.

79 - DIETSCHY J. M. and SIPERSTEIN M. D. - Effect of cholesterol feeding and fasting on sterol synthesis in seventeen tissues of the rat. J. Lipid Research., 1967, 8, 97.

80 - MASORO E. J. and PORTER E. - A comparaison of fatty acid synthesis by liver and kidney. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 1965, 118, 1090.

81 - HOHENLEITNER F. J. and SPITZER J. J. - Changes in plasma free fatty acid concentrations on passage through the dog kidney. Am. J. Physiol., 1961, 200, 1095.

82 - MARINETTI G. V., ERBLAND J., ALBRECHT M. and STOTZ E. - Time study of incorporation in vivo of $^{32}P$-orthophosphate into phosphatides of rat tissues. Biochim. Biophys. Acta, 1958, 30, 543.

83 - LEVIN E., JOHNSON R. M. and ALBERT S - Phospholipid metabolism in cell fractions of regenerating liver. Arch. Biochem. Biophys., 1958, 73, 247.

84 - DAWSON R. M. C. - The incorporation of labelled phosphate into the phosphoglycerides of intact rat liver. Biochem. J., 1955, 61, 552.

85 - WURSTER C. F. Jr. and COPENHAVER J. H. Jr. - Incorporation of phosphate-$^{32}P$ in rabbit kidney lecithins as a function of lecithin unsaturation. Biochim. Biophys. Acta, 1965, 98(2), 351.

86 - NELSON D. R. and CORNATZER N. E. - Role of the thyroid on the synthesis of heart, liver and kidney mitochondrial phospholipids. Endocrinology, 1965, 77(1), 37.

87 - PHILIPPSON Ch., LOEBE J. and GURSKY S. - $^{32}P$ incorporation into glycerylphosphorylcholine and glycerylphosphorylethanolamine of the cortical and medullary tissues of the rat kidney during diuresis and antidiuresis. Arch. Ges. Physiol., 1964, 281(2), 122.

88 - JATZKEWITZ H. - Zwei typen von cerebrosid-schwefelsäureestern als sog "Prälipoide" und Speichersubstanzen bei der leukodystrophie, typ Scholz (metachromatische form der diffusen Sklerose). Hoppe Seyler's Z.Physiol Chem., 1958, 311, 279.

89 - JATZKEWITZ H. - Die leukodystrophie, typ Scholz (metachromatische form der diffusen sklerose) als sphingolipoidose (cerebrosid-schwelsäure-ester-speicherkrankheit). Z. f. Physiol. Chem., 1960, 318, 263.

90 - MEHL E., JATZKEWITZ H. - Evidence for the genetic block in metachromatic leukodystrophy (ML). Biochem. Biophys. Res. Comm., 1965, 19(4), 407.

91 - AUSTIN J. H. - Some recent findings in leukodystrophies and in gargoylism p. 359 in "Inborn disorders of sphingolipid metabolism". Pergamon Press S. M. Aronson et B. W. Volk, éd.

92 - ROSE H. G. et OKLANDER M. - Improved procedure for the extraction of lipids from human erythrocytes. J. Lipid Research., 1965, 6, 428.

93 - FOLCH J., LEES M. and SLOANE STANLEY G. H. - A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. J.Biol. Chem., 1957, 226, 497.

94 - BORGSTROM B. - Investigations on lipid separation methods. Separation of cholesterol esters, glycerides and free fatty acids. Acta Physiol. Scandin., 1952, 25, 101.

95 - BORGSTROM B. - Investigation on lipid separation methods. Separation of cholesterol esters glycerides and free fatty acids. Acta Physiol. Scandin., 1952, 25, 111.

96 - AYRAULT-JARRIER M. - Action des détergents sur une β lipoprotéine isolée du sérum humain. Thèse de Sciences, Paris, 1959.

97 - POLONOVSKI J., ETIENNE J., PAYSANT M. et PETIT M. - Fractionnement chromatographique des phospholipides plasmatiques. Ann. Biol. Clin., 1959, 17, 186.

98 - STAHL E. - II - Mitteilung ; Standardisierung, Sichbarmachung, Dokumentation und Anwendung. Chemiker Zeitung. 1958, 82, 323.

99 - SKIPSKI V. P., PETERSON R. F. and BARCLAY M. - Separation of phosphatidylethanolamine, phosphatidylserine and other phospholipids by thin-layer chromatography. J. Lipid Research., 1962, 3, n° 4, 467.

100 - WAGNER G. - Neure ergebnisse auf dem gebiet der isolierung und analytik von phosphatiden und glycolipiden. Fette, Seifen, Anstrichmittel, 1960, 62, 1115.

101 - WAGNER H., HORHAMMER L. und WOLFF P. - Dünnschicht-chromatographie von phosphatiden und glykolipiden. Biochem. Z., 1961, 334, 175.

102 - DI COSTANZO G. et CLEMENT J. - Composition en acides gras des divers phospholipides de la muqueuse intestinale du rat à jeun et en période d'absorption. Bull. Soc. Chim. Biol. 1963, 45, 137.

103 - HABERMAN E., BANDTLOW G. und KRUSCHE B. - Bestimmung von plasma phospholipoiden nach dünnschichtchromatographie. Klin. Woch., 1961, 39, 816.

104 - HONEGGER C. G. - Über die dunnschicht-chromatographie von lipiden. 2 - Mitteilung untersuchung von gehirngewebe aus der weissen substanz multiple sclerose kranter. Helv. Chim. Acta, 1962, 45, 2020.

105 - ROBINSON N. et PHILLIPS B. M. - Quantitative thin layer chromatography of serum phospholipids. Clin. Chim. Acta, 1963, 8, 385.

106 - LEGRAND J. L. - Essai d'application de la chromatographie en couche mince à quelques lipides. Thèse de Pharmacie, Toulouse, 1963.

107 - SINGH H. and PRIVETT O. S. - Incorporation of $^{32}P$ in soybean phosphatides. Biochim. Biophys. Acta, 1970, 202, 200.

108 - NIEMINEN E. - Free and esterified cholesterol in human organs and tissues. Ann. Acad. Scien. Fenn., 1965, Séries A, V Medica 118.

109 - HOEVET S. P., VISWANATHAN C. V. and LUNDBERG W. O. - Fractionation of a natural mixture of alkenyl acyl and diacyl choline phosphatides by argentation adsorption thin-layer chromatography. J. Chromatog., 1968, 34, 195.

110 - VISWANATHAN C. V., HOEVET S. P. and LUNDBERG W. O. - Fractionation of a natural mixture of alkenyl acyl and diacyl ethanolamine phosphatides by argentation adsorption thin-layer chromatography. J. Chromatog., 1968, 35, 113

111 - VISWANATHAN C. V., BASILIO M., HOEVET S. P. and LUNDBERG W. O. - Reaction thin-layer chromatography in the analysis of mixtures of alkenyl acyl and diacyl phosphatides. J. Chromatog., 1968, 34, 241.

112 - ZINZADZE C. - ind. Eng. Chem. 1935, 7, 225. in Dittmer J. C., Lester R. L. - J. Lip. Res., 1964, 5, 126.

113 - SCHLEMMER W - Détermination des phosphatides par chromatographie sur couche mince de gel de silice. Boll. Soc. Ital. Biol. Sper., 1961, 37, 134.

114 - DELSAL J. L. et MANHOURI H. - Etude comparative des dosages colorimétriques du phosphore. Recherche d'une méthode de haute sensibilité applicable au dosage du phosphore organique dans les spots après chromatographie. Bull. Soc. Chim. Biol., 1955, 37, 1047.

115 - FISKE C. H. and SUBBAROW Y. - The colorimetric determination of phosphorus. J. Biol. Chem., 1925,, 66, 375

116 - ALLEN R. J. C. - The estimation of phosphorus. Biochem. J., 1940, 34, 858

117 - CHEN P. S., TORIBARA T. Y. and WARNER H. - Microdetermination of phosphorus. Anal. Chem., 1956, 28, 1756.

118 - SCHMIDT L. H. - Nature of difference in phospholipid content of oxalated and heparinized plasma. J. Biol. Chem., 1935, 109, 449.

119 - SCHMIDT G., BENOTTI J. and TANHAUSER S. J. - A micromethod for the quantitative partition of phospholipid mixtures into monoamino-phospholipid and sphingomyelin. J. Biol. Chem., 1946, 166, 505.

120 - LIEBERMAN-BURCHARD C. -Ueber das oxychinoterpen.Ber., 1885, 18, 1803.

121 - LEIKOLA E., NIEMINEN E. and SALOMAA E. - Occurence of methyl esters in the pancreas. J. Lipid Research., 1965, 6, 490.

122 - HANAHAN D. J. - The enzymatic degradation of phosphatidylcholine in diethylether. J. Biol. Chem., 1952, 195, 199.

123 - MINARI O., TSUBONO H., AKIYAMA M. and SAKAGAMI T. - Distribution and metabolism of two sphingomyelins in rat tissues. J. Biochem., (Tokyo) 1968, 64, 275.

# TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION ..... 4

PREMIERE PARTIE

TRAVAUX ANTERIEURS

I - COMPOSITION CHIMIQUE ..... 6

1 - Glucides ..... 6
2 - Protéines ..... 6
3 - Enzymes ..... 8
4 - Lipides ..... 9

a) Lipides totaux ..... 9
b) Lipides neutres ..... 10
c) Phospholipides ..... 11
d) Acides gras ..... 12
e) Sphingolipides ..... 14

II - ROLE DES LIPIDES RENAUX ..... 18

III- METABOLISME ..... 20

1 - Acides gras et lipides neutres ..... 20
2 - Phospholipides ..... 22
3 - Sulfatides ..... 23

DEUXIEME PARTIE

RECHERCHES PERSONNELLES

CHAPITRE I - METHODES D'ANALYSE ..... 27

I - PRELEVEMENT ET DISSECTION ..... 27

II - EXTRACTION DES LIPIDES ..... 27

III- PURIFICATION DES EXTRAITS ..... 28

IV - METHODES D'ANALYSES PROPREMENT DITES ..... 29

A - METHODES DE FRACTIONNEMENT ..... 29

1 - Chromatographie sur colonne ..... 29
2 - Chromatographie sur couche mince ..... 30

a) Phospholipides ..... 30
b) Lipides neutres ..... 31

3 - Réactifs d'identification ..... 32
4 - Chromatographie en phase gazeuse ..... 33

B - METHODES DE DOSAGE CHIMIQUE ..... 34

1 - Dosage du phosphore ..... 34
2 - Dosage du cholestérol ..... 35

C - ETUDE ISOTOPIQUE ..... 35

1 - Technique d'incorporation de $^{32}P$ ..... 35
2 - Technique de comptage ..... 36

CHAPITRE II - RESULTATS ..... 37

I - ETUDE ANALYTIQUE ..... 37

A - FRACTIONNEMENT DES LIPIDES ..... 37

1 - Sur colonne d'acide silicique ..... 37
2 - Par chromatographie en couche mince ..... 40

a) Lipides neutres ..... 40
b) Phospholipides ..... 44

- monodimensionnelle ..... 44
- bidimensionnelle ..... 44

B - DOSAGES CHIMIQUES ..... 48

1 - Cholestérol ..... 48

2 - Phospholipides ..... 49

C - COMPOSITION EN ACIDES GRAS ..... 50

1 - Acides gras libres ..... 50

2 - Triglycérides ..... 51

3 - Phospholipides ..... 52

a) Phospholipides totaux ..... 52

b) Glycérophospholipides ..... 54

c) Sphingomyélines ..... 54

II - ETUDE METABOLIQUE ..... 58

1 - Autoradiogrammes ..... 58

2 - Mesures des activités spécifiques ..... 64

CHAPITRE III - DISCUSSION DES RESULTATS. ..... 67

CONCLUSIONS ..... 71

BIBLIOGRAPHIE. ..... 73

Vu : Le Président de Thèse

L. DOUSTE-BLAZY

Vu et Permis d'imprimer

Toulouse le 29 juin 1970

Pour le Doyen :

l'assesseur,

G. MONNIER